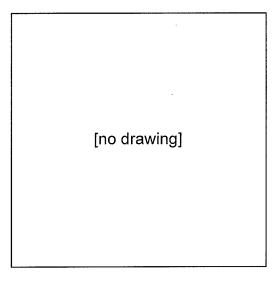
## MicroPatent® FullText Record

Help Close window

Order/Download	Family Lookup	Front Page	Legal Status
	JP310959	9 A	
<b>ELECTRONIC</b>	STRINGE	ED INST	RUMENT
WITH N	MEMORY I	FUNCTIO	NC
CASIO	COMPUTE	ER CO L	TD

## Abstract:

PURPOSE: To reproduce the performance of the stringed instrument with musical tones by successively storing the time information which indicates the timing of a string touch operation and the pitch information corresponding to a fingering operating position as performance information at every time when the string touch operation is detected by a detecting means.



CONSTITUTION: The time information indicating the timing of the string touch operation and the pitch information corresponding to the detected fingering operation position are stored as performance information successively into a performance information memory means 33 at every time when the string touch operation is detected by an input section 31 consisting of a pitch switch and trigger switch as the detecting means. The performance contents of the stringed instrument by the fingering operations and the string touch operations can be stored in real time in this way and the stored contents can be reproduced afterward with the musical tones in real time.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

#### Inventor(s):

MANABE HIROSHI MURATA YOSHIYUKI

**Application No. JP1990224255A Filed 19900828 Published 19910509** 

Original IPC(1-7): G10H000100

G10H000138 G10H000100 G10H000100 G10H000138

Current IPC-R:

	invention		additional
Advanced	G10H000138	20060101	
	G10H000100	20060101	

	invention	additional
Core	G10H000138 20060	101
	G10H000100 20060	101

## **Priority:**

JP1990224255A 19900828

## **Patents Cited:**

→ JP57115596 A 19820719 ROBAATO DEI POURUSON [0]

## **Patents Citing This One:**

→ JP3921817 B2 20070530

For further information, please contact: <u>Tech Support | Billing | Sales</u>

#### (19)日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3109599号

(P3109599)

(45)発行日 平成12年11月20日(2000.11.20)

(24)登録日 平成12年9月14日(2000.9.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>		識別記号	FΙ		
C 1 2 Q	1/68	ZNA	C 1 2 Q	1/68	ZNAA
C 1 2 N	15/09		C 1 2 N	15/00	Α
C 1 2 R	1:44)				
	1:01)				

請求項の数39(全 55 頁)

(21)出願番号	特願平3-508127	(73)特許権者	999999999
(86) (22)出願日	亚帝 2 年 4 日 10 日 /1001 - 4 - 10)		エヌ・ベー・イノヘネテイクス・エス・ アー
(00) (22)山麓日	平成3年4月18日(1991.4.18)		ァー ベルギー国、ベーー9710・ヘント、ボツ
(65)公表番号	特表平5-504889		クス・4、インドウストリーパルク・ズ
(43)公表日	平成5年7月29日(1993.7.29)		ベイナールデ・7
(86)国際出願番号	PCT/EP91/00743	(72)発明者	ロツサウ,リユデイ
(87)国際公開番号	WO91/16454		ベルギー国、ベー―2070・エケレン、ウ
(87) 国際公開日	平成3年10月31日(1991, 10, 31)		イルヘフーベストラート・45
審查請求日	平成5年1月18日(1993.1.18)	(74)代理人	99999999
審判番号	<b>平7-26368</b>		弁理士 川口 義雄 (外3名)
審判請求日	平成7年12月4日(1995.12.4)		
(31)優先権主張番号	90401054. 3	合議体	
(32)優先日	平成2年4月18日(1990.4.18)	審判長	佐伯 裕子
(33)優先権主張国	イギリス(GB)	審判官	藤田 節
		審判官	眞壽田 順啓
			最終頁に続く

## (54) 【発明の名称】 16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブ リダイゼーションプローブ

#### (57)【特許請求の範囲】

【請求項1】検出すべき細菌種の16Sおよび23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域の約15~約100連続ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド配列から構成され、tRNA遺伝子配列を含まないプローブを用いて細菌種を特異的に検出する方法であって、16S及び23SrRNA遺伝子の3′末端及び5′末端の保存領域に割り当てられたプライマーを使用して標的部位を酵素増幅し、前記プローブを前記増幅標的部位へハイブリダイゼーションさせる工程を含む方法。

【請求項2】前記オリゴヌクレオチド配列が、

検出すべき生物の16Sおよび23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のスペーサー領域配列と比較し、

検出すべき生物の16Sおよび23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域の約15~約100の連続ヌクレオチドの配列であって、最近隣種のうちの少なくとも1種のスペーサー領域配列との間に少なくとも1つのミスマッチを有するヌクレオチド配列を選択することにより、選択される請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

## -核酸グループ:グループ NGI1:

120,000	, iv , , ,	// / Mull.	
CGATGCGTCG	TTATTCTACT	TCGC	NGI1
GCGAAGTAGA	ATAACGACGC	ATCG	NGITIC
GCGAAGUAGA	AUAACGACGC	AUCG	NGI11CR
CGAUGCGUCG	UUAUUCUACU	UCGC	NGI1R
グループ NG	12:		
TTCGTTTACC	TACCCGTTGA	CTAAGTAAGC AAAC	NG12
GTTTGCTTAC	TTAGTCAACG	GGTAGGTAAA CGAA	NG121C
GUUUGCUUAC	UUAGUCAACG	GGUAGGUAAA CGAA	NGIZICR
UUGGUUUACC	UACCCGUUGA	CUAAGUAAGC AAAC	NG12R
グループ NM	II1:		
GGTCAAGTGT	GACGTCGCCC	TG	NMI1
CAGGGCGACG	TCACACTTGA	cc	NMI11C
CAGGGCGACG	UCACACUUGA	cc	NMI1ICR
GGUCAAGUGU	GACGUCGCCC	UG	NMI1R
グループ NM	12:		
GTTCTTGGTC	AAGTGTGACG	TC	NMI2
GACGTCACAC	TTGACCAAGA	AC	NMI2IC
GACGUCACAC	UUGACCAAGA	AC	NMI2ICR
GUUCUUGGUC	AAGUGUGACG	UC	NMI2R
グループNM	13:		
GCGTTCGTTA	TAGCTATCTA	CTGTGC	NMI3
GCACAGTAGA	TAGCTATAAC	GAACGC	NMI31C
GCACAGUAGA	UAGCUAUAAC	GAACGC	NMI31CR
GCGUUCGUUA	UAGCUAUCUA	CUGUGC	NMI3R
グループ NM	I4:		
TGCGTTCGAT	ATTGCTATCT	ACTGTGCA	NMI4
TGCACAGTAG	ATAGCAATAT	CGAACGCA	NMI4IC
UGCACAGUAG	AUAGCAAUAU	CGAACGCA	NMI4ICR
UGCGUUCGAU	AUUGCUAUCU	ACUGUGCA	NMI4R

## グループ NMI5:

970 7 Milo.	
TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTC	TGTTCCATT
	NMI5
AATGGAACAGAATCCATTCAGGGCGACGTCACACTTGACCA	AGAACAAAA
	NMI51C
AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCA	AGAACAAAA
	NMI51CR
UUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCCUGAAUGGAUUC	UGUUCCAUU
	NMI5R
グループ NMI6:	
TTTGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC	NMI6
GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA	NM161C
GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA	NMI61CR
UUUGCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC	NMI6R
グループ HDI1:	
TTATTATGCG CGAGGCATAT TG	HDI1
CAATATGCCT CGCGCATAAT AA	HDIIIC
CAAUAUGCCU CGCGCAUAAU AA	HD111CR
UUAUUAUGCG CGAGGCAUAU UG	HD I 1R
グループ BCI1:	
TTAAACATCT TACCAAAG	BCII
CTTTGGTAAG ATGTTTAA	BCIIIC
CUUUGGUAAG AUGUUUAA	BCITICR
UUAAACAUCU UACCAAAG	BCI1R
グループ BCI2:	
TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA	BCI2
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BCI2IC
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BCI2ICR
UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA	BCI2R

グループ BPI1:					
CCACACCCAT	CCTCTGGACA	GGCTT	BPI1		
AAGCCTGTCC	AGAGGATGGG	TGTGG	BPIIIC		
AAGCCUGUCC	AGAGGAUGGG	UGUGG	BPITICR		
CCACACCCAU	CCUCUGGACA	GGCUU	BPI1R		
グループ HI	11:				
ACGCATCAAA	TTGACCGCAC	TT	HII1		
AAGTGCGGTC	AATTTGATGC	GT	HIIIIC		
AAGUGCGGUC	AAUUUGAUGC	GU	HIIIICR		
ACGCAUCAAA	UUGACCGCAC	VU	HII1R		
グループ HI	12:				
ACTTTGAAGT	GAAAACTTAA	AG	HI12		
CTTTAAGTTT	TCACTTCAAA	GT	HIIZIC		
CUUUAAGUUU	UCACUUCAAA	GU	HII2ICR		
ACUUUGAAGU	GAAAACUUAA	AG	HII2R		
グループ SA	11:				
AATCGAAAGG	TTCAAATTGT	T	SAI1		
AACAATTTGA	ACCTTTCGAT	T	SAIIIC		
AACAAUUUGA	ACCUUUCGAU	U	SAIIICR		
AAUCGAAAGG	UUCAAAUUGU	U	SAI1R		
グループ SA	12:				
GGAAACCTGC	CATTTGCGTC	TT	SA12		
AAGACGCAAA	TGGCAGGTTT	CC	SAIZIC		
AAGACGCAAA	UGGCAGGUUU	CC	SA121CR		
GGAAACCUGC	CAUUUGCGUC	UU	SAI2R		
グループ SAI3:					
TCCACGATCT	AGAAATAGAT	TGTAGAA	SAI3		
TTCTACAATC	TATTTCTAGA	TCGTGGA	SAI3IC		
UUCUACAAUC	UAUUUCUAGA	UCGUGGA	SA131CR		

SAI3R

UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA

#### グループ SAI4:

TCTAGTTTTA AAGAAACTAG GTT SAI4

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA SAI4IC

AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA SA141CR

UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUU SA14R

グループ SPI1:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA SPI1

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC SPILIC

UGCAUUACUU GGUGAUCUCU CAC SPI1ICR

GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA SPIIR

グループ SPI2:

AGGAACTGCG CATTGGTCTT SP12

AAGACCAATG CGCAGTTCCT SPI2IC

AAGACCAAUG CGCAGUUCCU SPI2ICR

AGGAACUGCG CAUUGGUCUU SP12R

グループ SPI3:

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA SP13

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC SPI3IC

UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC SP131CR

GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA SPI3R

から選択される検出すべき細菌種の16Sおよび23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域の核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含み、tRNA遺伝子配列を含まないことを特徴と

するプローブ。

【請求項4】1種以上のNeisseria gonorrhoeae株を検 出するためのプローブであって、

## -核酸グループ:

## グループ NGI1:

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC NGI1

GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG NGI1IC

GCGAAGUAGA AUAACGACGC AUCG NGIIICR

CGAUGCGUCG UUAUUCUACU UCGC NGIIR

## グループ NGI2:

TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC NGI2

GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA NG121C

GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA NG121CR

#### UUGGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC NGI2R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項5】生物学的サンプル中でNeisseria gonorrh oeae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項4に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 6 】ハイブリダイゼーション媒体が、約 3 × SS C (1 × SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0) 、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約 3 × SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項4に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約50℃の範囲及び/又は洗浄温度が約50℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

#### GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

HT及び/又はWT:50℃、

#### GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA

HT及び/又はWT:50℃であることを特徴とする請求項5

に記載の生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae を検出するための方法。

【請求項7】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのNeisseria gonorrhoeae株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのNeisse ria gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がNeisseria gonorrhoeaeに対して特異的であり且つ請求項4に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を 生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成する ために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と

【請求項8】1種以上のNeisseria meningitidis株を 検出するためのプローブであって、

## -核酸グループ:

## グループ NMI1:

NMI1 GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG CAGGGCGACG TCACACTTGA CC NMI1IC CAGGGCGACG UCACACUUGA C NMI1ICR GGUCAAGUGU GACGUCGCCC UG NMI1R グループ NMI2: GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC NMI2 GACGTCACAC TTGACCAAGA AC NMI2IC GACGUCACAC UUGACCAAGA AC NMI2ICR GUUCUUGGUC AAGUGUGACG UC NMI2R グループ NMI3: GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC NMI3 GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC NMI3IC GCACAGUAGA UAGCUAUAAC GAACGC NMI3ICR GCGUUCGUUA UAGCUAUCUA CUGUGC NMI3R グループ NMI4: TGCGTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA NMI4 TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA NMI4IC UGCACAGUAG AUAGCAAUAU CGAACGCA NMI4ICR UGCGUUCGAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA NMI4R グループ NMI5: TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT AATGGAACAGAATCCATTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA NMI5IC AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA NMI5ICR UUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCCUGAAUGGAUUCUGUUCCAUU

NMI5R

## グループ NMI6:

TTTGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC NMI6

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA NM161C

GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA NM161CR

## UUUGCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC NMI6R

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項9】生物学的サンプル中でNeisseria meningi tidis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るNeisseria meningitidis株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項8に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るNeisseria meningitidis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項10】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0) 、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アル

ブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの 剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項8に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40~58℃の範囲とび/又は洗浄温度が約40~58℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

## CAGGGCGACG TCACACTTGA CC

HT及び/又はWT:45℃、

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

HT及び/又はWT:45℃、

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC

HT及び/又はWT:40℃、

TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA

HT及び/又はWT:48℃、

#### TTTTGTTCTTGGTCAAGGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

HT及び/又はWT:58℃、

#### GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA

HT及び/又はWT:50℃であることを特徴とする請求項9 に記載の生物学的サンプル中でNeisseria meningitidi sを検出するための方法。

【請求項11】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのNeisseria meningitidis株をin vitro検出するためのキットであって、-請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-これらのプローブと多数の、好ましくは全てのNeisse ria meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がNeisseri

a meningitidisに対して特異的であり且つ請求項8に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとNeisseria meningitidis株のDNA 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を 生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成する ために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は -固体支持体に固定された請求項8に記載のプローブの

- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとNeisseria meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。 【請求項12】1種以上のHaemophilus ducreyi株を検出するためのプローブであって、

## - 核酸グループ:

グループ HDI1:

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA

CAAUAUGCCU CGCGCAUAAU AA

UUAUUAUGCG CGAGGCAUAU UG

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項13】生物学的サンプル中でHeamophilus duc reyi株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るHaemophilus ducreyi株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項12に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus ducreyi株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項14】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項12に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

#### CAATATGCCT CGCGCATAAT AA

HT及び/又はWT:40℃であることを特徴とする請求項13 に記載の生物学的サンプル中でHaemophilus ducreyiを HD I 1

HDI11C

HDI11CR

HDI1R

検出するための方法。

【請求項15】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのHaemophilus ducreyi株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのHaemop hilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がHaemophilus ducreyiに対して特異的であり且つ請求項12に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。

緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

【請求項16】1種以上のBranhamella catarrhalis株を検出するためのプローブであって、

### -核酸グループ:

#### グループ BCI1:

TTAAACATCT TACCAAAG BCI1

CTTTGGTAAG ATGTTTAA BCI1IC

CUUUGGUAAG AUGUUUAA BCIIICR

UUAAACAUCU UACCAAAG BCIIR

グループ BCI2:

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA BC12

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA BC121C

UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA BC121CR

#### UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項17】生物学的サンプル中でBranhamella cat arrhalis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るBranhamella catarrhalis株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項16に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るBranhamella catarrhalis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項18】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項16に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30~42℃の範囲及び/又は洗浄温度が約30~42℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及びい洗浄温度(WT)が夫々、

## CTTTGGTAAG ATGTTTAA

BC12R

HT及び/又はWT:30℃

#### TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

HT及び/又はWT:42℃であることを特徴とする請求項17 に記載の生物学的サンプル中でBranhamella catarrhal isを検出するための方法。

【請求項19】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのBranhamella catarrhalis株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのBranha mella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBranhame lla catarrhalisに対して特異的であり且つ請求項16に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとBranhamella catarrhalis株のDN A及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項16に記載のプローブの いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
- -該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素

的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、 一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブ とBranhamella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの 間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可 能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分 と、 -前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。

【請求項20】1種以上のBordetella pertussis株を 検出するためのプローブであって、

#### -核酸グループ:

#### グループ BPI1:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT BP11

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG BP111C

AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG BP111CR

CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項21】生物学的サンプル中でBordetella pert ussis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るBordetella pertussis株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項20に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るBordetella pertussis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項22】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項20に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

#### AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG

HT及び/又はWT:55℃であることを特徴とする請求項21

に記載の生物学的サンプル中でBordetella pertussis を検出するための方法。

BP11R

【請求項23】生物学的サンプル中で多数、好ましくは 全Bordetella pertussis株をin vitro検出するための キットであって、

ー請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのBordet ella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBordetel la pertussisに対して特異的であり且つ請求項20に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブ

とBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

#### -核酸グループ:

#### グループ HII1:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT HIII

AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT HIIIIC

AAGUGCGGUC AAUUUGAUGC GU HII1ICR

ACGCAUCAAA UUGACCGCAC U HIIIR

グループ HII2:

ACTTTGAAGT GAAAACTTAA AG HII2

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT HI12IC

CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GU HI121CR

ACUUUGAAGU GAAAACUUAA AG

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項25】生物学的サンプル中でHaemophilus inf luenzae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項24に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項26】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35~55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35~55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

## AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT

HII2R

HT及び/又はWT:55℃、

#### CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT

HT及び/又はWT:35℃であることを特徴とする請求項25 に記載の生物学的サンプル中でHaemophilus influenza eを検出するための方法。

【請求項27】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのHaemophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのHaemop hilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ

リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は 一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がHaemophi lus influenzaeに対して特異的であり且つ請求項24に 記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくと も2種のプローブと、

ーこれらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を 生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成する ために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、 -酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブ とHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの 間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可 能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分

-核酸グループ:

グループ SPI1:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA SPI1

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC SPILIC

UGCAUUACUU GGUGAUCUCU CAC SPI1ICR

GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA SPIIR

グループ SPI2:

AGGAACTGCG CATTGGTCTT SP12

AAGACCAATG CGCAGTTCCT SPI2IC

AAGACCAAUG CGCAGUUCCU SPI2ICR

AGGAACUGCG CAUUGGUCUU SPI2R

グループ SPI3:

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA SP13

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC SPI3IC

UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC SPI3ICR

GAGUUDAUGA CUGAAAGGUC AGAA

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項29】生物学的サンプル中でStreptococcus p neumoniae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るStreptococcus pneumoniae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項28に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るStreptococcus pneumoniae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項30】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×

と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。

【請求項28】1種以上のStreptococcus pneumoniae 株を検出するためのプローブであって、

SP I 3R SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項28に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲及び/又は洗浄温度が約45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

HT及び/又はWT:45℃、

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

HT及び/又はWT:45℃、

#### TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

HT及び/又はWT:45℃であることを特徴とする請求項29 に記載の生物学的サンプル中でStreptococcus pneumon iaeを検出するための方法。

【請求項31】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのStreptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項28に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのStrept ococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は -同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がStreptoc occus pneumoniaeに対して特異的であり且つ請求項28 に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なく とも2種のプローブと、

## - 核酸グループ:

## グループ SAI1:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T SAI1

AACAATTTGA ACCTTTCGAT T SAI1IC

AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U SAI1ICR

と、

CALID.

AAUCGAAAGG UUCAAAUUGU U SAIIR

グループ SAI2:

GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT SA12

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC SAI2IC

AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC SA121CR

GGAAACCUGC CAUUUGCGUC UU SAI2R

#### グループ SAI3:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TGTAGAA SA13
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA SA131C
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCGUGGA SA131CR
UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA SA13R

ーこれらのプローブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項28に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。

可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分

【請求項32】1種以上のStreptococcus agalactiae 株を検出するためのプローブであって、

#### グループ SAI4:

TCTAGTTTTA AAGAAACTAG GTT

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA

AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA

UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUU

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項33】生物学的サンプル中でStreptococcus a galactiae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るStreptococcus agalactiae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項32に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るStreptococcus agalactiae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項34】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項32に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35~45℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35~45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

## AACAATTTGA ACCTTTCGAT T

HT及び/又はWT:35℃、

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC

HT及び/又はWT:45℃、

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA HT及び/又はWT:45℃、

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA

SAI4

SAI4IC

SAI41CR

#### SAI4R

HT及び/又はWT:37であることを特徴とする請求項33に 記載の生物学的サンプル中でStreptococcus agalactia eを検出するための方法。

【請求項35】生物学的サンプル中で多数の、好ましく は全てのStreptococcus agalactiae株をin vitro検出 するためのキットであって、

ー請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのStrept ococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は -同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がStreptoc occus agalactiaeに対して特異的であり且つ請求項32 に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なく とも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAと

とStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。

【請求項36】生物学的サンプル中でCampylobacter j ejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法であって、プローブの標的配列にフランキングする2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を応用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションでき

るようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブ とサンプル中に存在し得るCampylobacter jejuni及びC ampylobacter coli株の相補的核酸との間のハイブリダ イゼーションを可能にする条件下で1種以上のCampylob acter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するた めのプローブであって、プローブが適切な条件でCampyl obacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及 び/又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のD NA及び/又はRNAとはハイブリダイズしないという条件 下で、図10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から選択 される15~最大数の連続したクレオチドの配列又はその 相補配列を含むことを特徴とするプローブと接触させる 段階と、特にサンプル中に存在し得るCampylobacter j ejuni及びCampylobacter coli株のDNA及びRNAの両方と ハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形 成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴 とする請求項1に記載の方法。

【請求項37】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vitro検出するためのキットであって、

-1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのプローブであって、プローブが適切な条件でCampylobacter jejuni及びCampylobact er coli由来のDNA及び/又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のDNA及び/又はRNAとはハイブリダイズしないという条件下で、図10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から選択される15~最大数の連続したヌクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数、好ましくは全Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliに対して特異的であり且つ前記プローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された前記プローブのいずれかから 選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素

的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。

【請求項38】検出すべき微生物に特異的な請求項3、4、8、12、16、20、24、28及び32のいずれか一項に記載のプローブを使用して生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するための方法であって、好ましくはプローブ領域にフランキングする少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する(標的配列を含む)DNA及び/又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のプローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することを特徴とする方法。

【請求項39】生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するためのキットであって、

ー検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした請求項3、4、8、12、16、20、24、28及び32のいずれか一項に記載のプローブの少なくとも1種と、

- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブ と検出すべき微生物のDNA及び/又はRNAとの間にハイブ リダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液 又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴と するキット。

#### 【発明の詳細な説明】

本発明は、ハイブリダイゼーション手順により生物学的サンプル中で非ウイルス微生物の特異的検出に使用するための、リボソームリボ核酸(rRNA)遺伝子、特に16 S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される核酸プローブに係る。

ここ10年間に多数の微生物で目覚ましい進歩が遂げられているが、現在使用されている診断手順はまだ手間がかかり、非感受性であり、非特異的である。これらの欠点の多くは核酸プローブを使用することにより解決することができる。これらの核酸プローブの例としては、全ゲノムデオキシリボ核酸(DNA)、プラスミド、リボプ

ローブ又は合成オリゴヌクレオチドを挙げることができ、これらのプローブは生物学的サンプル中に存在するゲノムDNA、メッセンジャーRNA又は安定RNA種を標的にすることができる。必ずしもそうでなくてもよいが、合成オリゴヌクレオチドを使用すると好適である。オリゴヌクレオチドは化学的方法を使用して迅速に大量に合成することができ、貯蔵寿命が長く、容易に精製及び標識できる。

DNAプローブ技術を使用して微生物を確実に診断にするためには、使用されるプローブは高特異生(即ち他の生物に由来する核酸と交差反応すべきでない)且つ高感度(即ち検出しようとする生物の全部ではないとしてもほとんどの株がプローブと反応すべきである)であるべきである。従って、好適標的配列は以下の特徴を有するべきである。

- (i)配列は該当生物の各株のゲノム中に存在すべきで ある。
- (ii) 進化による配列の相違は、一方では該当種を他の密接に関連する種から区別できるようにするために十分な配列相違があり、他方では使用されるプローブで該当種の全株を検出できるようにするために十分な配列保存があるように構成されるべきである。

種特異的プローブは多数の生物について記載されている。最近の文献ではTenover, Clin. Microbiol. Rev.  $\underline{\mathbf{1}}$ :82 -101, 1988を参照されたい。

しかしながら、ゲノム中のどの遺伝子から特異的プローブ配列を誘導できるのかについては不明である。プローブ開発にあたっては、最終的に対象生物に対して特異的になるようなフラグメントを得るために大規模な選択手順に従わなければならないことが多かった(Korolik

et al., J. Gen. Microbiol.  $\underline{134}$ :521—529, 1988; Grimon t et al., J. Clin. Microbiol.  $\underline{21}$ :431—437, 1985; Welch er et al., Nucl. Acids Res.  $\underline{14}$ :10027—10044, 1986; Donegan et al., Mol. Cell. Probes  $\underline{3}$ :13—26, 1989; Be aulieu and ROY, Abstract nr D249, Abstracts of

the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1989)。ほとんどの場合、特異的フラグメントが誘導される遺伝子の機能又は実態は解明されておらず、別の特異的プローブが所望される毎にスクリーニング手順を手探りで繰り返さなければならない。上記基準を満たし且つ偏在する遺伝子が厳密に同定されるならば、時間と手間のかかる選択が不要になる。

16S又は23SrRNA遺伝子は、既に記載されている方法を使用して配列を容易に得ることができ、種特異的検出に使用可能なこれらの高保存性遺伝子内に種々の領域が存在することが知られているので、プローブ開発に頻用されている。しかしながら、生物によっては進化による核酸配列保存性が非常に高いため、例えば16S及び23SrRNA遺伝子から高特異性で高感度のプローブを誘導できない場合がある。更に、これらの遺伝子の保存性の結果、標

的配列のみで1又は少数のミスマッチに基づいて2種の 生物を区別しなければならないことが多くなり、ハイブ リダイゼーションのストリンジェンシーが必要になる。 これらの条件から少しでも外れると、誤認の恐れがあ る。

従って、16S及び23SrRNA遺伝子から特異的プローブを 誘導することができなかった種を含むほとんどの生物に 種特異的なプローブを開発することができ、好ましくは より広いストリンジェンシー範囲を有する偏在遺伝子を 特徴付けることができるならば、非常に有利である。

各細胞生物は、その転写物がリボソームの機能とタン パク質の合成とに不可欠であるため、リボソームRNAシ ストロンを有する。一般に、遺伝子はゲノム中に多重コ ピー存在する。真正細菌では16SrRNA遺伝子[小サブユ ニットrRNA (srRNA) に同じ] はrRNAシストロンの5' 未満に位置し、23SrRNA [大サブユニットrRNA (1rRNA) に同じ]が後続する。5SrRNA遺伝子はシストロンの3<sup>1</sup> 末端に位置する。16S、23S及び5S遺伝子はスペーサー領 域により分離され、これらのスペーサー領域には転写後 プロセッシングに関与する転移RNA (tRNA) 遺伝子及び シグナル配列が位置し得る。まず最初にrRNAシストロン は前駆物質RNA分子として転写される。この一次転写物 はエンドリボヌクレアーゼ及びエキソリボヌクレアーゼ により更にプロセッシングされ、成熟産物を生成する。 従って、スペーサー領域配列は生物のゲノム中のみに存 在するのではなく、前駆体RNA分子及びプロセッシング 産物中にも存在する。真正細菌rRNAシストロンの構造及 びプロセッシングは、Gegenheimer and Apirion, Micr obiol. Rev. 45:502-541, 1981に詳細に記載されている。

真核生物の核ゲノム中の状況は多少異なり、srRNA及び1rRNA間に5.8SRNA遺伝子が位置しており、5SrRNA遺伝子は別個の長いタンデムアレー中に配置されている(Perry, Annu. Rev. Biochem. 45:605-629, 1976; Long and Dawid, Annu. Rev. Biochem. 49:727-764, 1980)。しかしながら、真核生物のミトコンドリア又はクロロプラスト中のrRNAシストロンは実際に原核生物である(Borst and Grivell, Nature 290:443-444, 1981)。

文献には非常に少数の真核又は原核生物のスペーサー領域の核酸配列しか記載されていない (例えばYoung et al., J. Biol. Chem. 254:3264-3271, 1979;及びMartens et al., System. Appl. Microbiol. 9:224-230, 1987)。これらのデータから核酸配列保存を確実に予想することはできず、従って、特異的プローブの選択のためのスペーサー領域の適応については全く推定することができない。

より詳細には、真核生物に関して、生物学的サンプル中で微生物の検出に使用され、16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるハイブリダイゼーションプローブは未だに報告されていない。真核生物の大小サブユニットrRNA遺伝子間の対応するスペーサー領域に

ついても何ら解明されていない。

真核生物に関する限り、リボソーム遺伝子スペーサーからクローニングされたフラグメントの使用がLeishman iaに関する分類学的研究に記載されている(Ramirez a nd Guevara, Mol. Bioch. Parasitol. 22:177-183, 1987)。しかしながら、使用された領域及び研究のアプローチは、特に以下に述べる理由により、小rRNA及び大rR NA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるプローブを使用するために当業者には無益である。

- (i) Ramirez及びGuevaraにより使用されたリボソーム 遺伝子スペーサーはsrRNA及び1rRNA間のスペーサー領域 ではなく、2つの隣接するrRNAシストロン間に存在する 配列であり、このようなスペーサーは真核生物ではrRNA シストロンの反復単位間にしか見いだされず、srRNA及 び1rRNA遺伝子間の内部スペーサーには無関係である。
- (ii) 遺伝子スペーサーフラグメントを使用するLeishm ania分類群間の区別は、制御フラグメントパターンを比較することにより得られ、使用されるフラグメントは非特異的である。

従って、サザンブロット分析を用いずに簡単なハイブ リダイゼーションプロトコルを使用してフラグメントで 区別することは不可能である。

リボソーム遺伝子スペーサー中に高特異的プローブが 存在し得るということも立証されていない。

従って、本発明の目的は、細菌種のような特定生物の rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される種特異的 プローブを提供することである。

本発明の別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neiss eria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23SrRNAスペーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。

本発明の更に別の目的は、ドットスポット、鎖置換、コンペティション、サンドイッチ又は逆ハイブリダイゼーション試験のようなハイブリダイゼーション試験により生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23SrRNA遺伝子スペーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。本発明の更に別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCa

mpylobacter coli株のin vitro診断用プローブ及び簡単な診断方法を提供することである。

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細菌のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

本発明はより詳細には、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細菌のrRNA遺伝子間、特に16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域の約15ヌクレオチド〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくはスペーサー領域の約15〜約100ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

以下の文中で「スペーサー領域」なる用語は、rRNA遺伝子間、より特定的には16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域を意味する。

本発明は、検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細菌に固有であるように選択された rRNA遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリダイズ するために十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する 段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用プローブに係り、rRNA遺伝子間のスペーサー領域の前記配列は、

ー\*目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のrBNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較し、

\*最近隣種のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくはスペーサー領域の約15~ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15~約100ヌクレオチドの配列を選択することにより、又はー\*短縮スペーサー領域を得るように、目的生物のスペーサー領域からtRNA遺伝子及び場合によりシグナル配列を欠失させ、

\*少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15~スペーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15~約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試験錯誤により決定することにより選択される。

本発明は特に、rRNA遺伝子間のスペーサー領域が16SrRNA遺伝子及び23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域であるようなプローブに係る。

追って概説するように、数種の微生物のスペーサー領域をクローニングし、配列決定及び比較した。比較の結果、スペーサー領域の核酸配列は高保存性のrRNA遺伝子に比較して半保存性(semi-conserved nature)であることが判明した。従って、スペーサー領域はrRNA遺伝子それ自体よりもプローブの開発に好適である。図1、2及び10は、高度に関連する生物(例えば同一遺伝種からの高度に関連する株)間に高度の配列相同性があること

を示す。図3及び7に示すように、並の関連性を有する 生物間では多少大きい配列相違が認められた。図4~6 に示すように、関連性の低い種間では顕著な配列相同性 は(tRNA配列を除き)全くないことが判明した。

下記表では、異なる株の16SrRNA配列の相同値(16S hom)(配列相同%)を、スペーサー領域の対応する相

同値(スペーサーhom)に比較した。相同値(16S hom 及びスペーサーhom)は、Intelligentics Inc.及びGen ofit SA製PC Geneソフトウェア(1989年4月20日リリース6.01)を使用して計算した。比較したヌクレオチドの総数を括弧内に示す。この結果から明らかなように、スペーサー領域は16SrRNA分子よりも低保存性である。

比較株			スペーサー
株 1	株 2	hom	hom
N. gonorrhoeae	N. gonorrhoeae	99.9%	100%
NCTC 8375	ITG 4367	(1434)	(335)
B. pertussis	B. bronchiseptica	100%	98.1%
ATCC 10380	NCTC 452	(417)	(582)
N. gonorrhoeae	N. meningitidis	99%	93.5%
NCTC 8375	NCTC 10025	(1452)	(603)
B. catarrhalis	M. nonliquefaciens	97.9%	87.1%
ITG 4197	ATCC 19975	(1244)	.(498)
B. pertussis	N. gonorrhoeae	86.3%	58.4%
ATCC 10380	NCTC 8375	(998)	(582)
B. catarrhalis	N. gonorrhoeae	83.8%	68.1%
ITG 4197	NCTC 8375	(1485)	(498)
H. ducreyi	E. coli	88.3%	67.1%
CIP 541		(1498)	(346)

この結果、関連する対象病原種(即らNeisseria gon orrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella cata rrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenz ae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactia e, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni

及びCampylobacter coli株)のスペーサー領域配列から種特異性及び感度の高いプローブを誘導することができた。16S及び/又は23SrRNA分子中で高特異性プローブを見いだすことができなかったNeisseria meningitidis及びBordetella pertussis種のスペーサー領域からも

有用なプローブを誘導することができた。本明細書に記載する以外の種(例えば他のCampylobacter種、他のHae mophilus種、Actinobacillus種、Bacteroides種、chlam ydia種等)の特異的プローブも同様にスペーサー領域配列から誘導できる。

16S及び23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域から誘導されるプローブの標的は、検出すべき細胞中に存在するゲノムDNA及び前駆体RNA分子である。前駆体RNA分子は一本鎖であり、多重コピー存在し得るので、前駆体RNA分子を検出すると有利である。他方、DNA分子はRNA分子よりも酵素分解を非常に受けにくい。従って、ハイブリダイゼーション前にRNA分解を生じないように十分に生物学的サンプルを処理及び/又は保存できない場合には、DNAターゲッティングが好適である。

16S-23SrRNA転写スペーサー領域から誘導されるプローブの別の利点は、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) を使用する酵素増幅後に標的検出する点にある。多くの微生物のスペーサー領域は例えば、夫々16S及び23SrRNA遺伝子

の3′末端及び5′末端の保存領域に割り当てられた同一プライマーを使用して酵素的に増幅され得る。rRNA遺伝子の高保存性を利用すると、同一試薬及びプロトコルを使用して好適には同時に多数の生物のスペーサー領域を増幅し、その後、該当生物のスペーサー領域に特異的にターゲッティングするプローブを使用して増幅フラグメントを検出することができる。同時に増幅されたフラグメントの同時且つ特異的検出のために有利な方法は、逆ハイブリダイゼーションである。

スペーサー領域は保存配列により夾叉されているので、この領域をPCR技術によりクローニング及び配列決定するのは簡単であり、同一プロトコルを多種の生物に適用することができる。従ってスペーサー領域の配列は、16S又は23SrRNAに割り当てられた保存プライマーを使用するrRNA遺伝子の酵素的増幅により得られる。スペーサー領域を占めるフラグメントの増幅に使用可能な塩基プライマー対の例を以下に挙げる。

## プライマー対1: TGGCTCAGAT TGAACGCTGG CGGC及び

### CCTTTCCCTC ACGGTACTGG T

## プライマー対2: TGGGTGAAGT CGTAACAAGG TA及び

## CACGTCCTTC GTCGCCT.

増幅したフラグメントをそのまま、又は固有制限部位を認識する制限酵素で消化後に2つのサブフラグメントとしてクローニングすることができる。M13でPCR産物をクローニングするためのストラテジーは、Medlin et al. (Gene 71:491-499,1988) に記載されている。

同一ストラテジーを使用してプラスミドベクターでクローニングすることができる。このアプローチによると、塩基プライマーの5′末端から固有制限部位を含むヌクレオチド配列を伸長させ、フラグメントを順方向にクローニングする。プラスミドベクターにクローニング後、ジデオキシチェーンターミネーション法を使用してスペーサー領域を配列決定することができる。

このアプローチはゲノムバンク又は選択された制限エンドヌクレアーゼフラグメントを使用する従来のクローニング手順に比較して著しく簡単で時間がかからない。

クローニングせずにPCRフラグメントで配列決定反応を直接実施すると、より迅速に配列情報が得られるが、クローン化フラグメントから生成された配列情報のほうがより正確且つ完全である。PCRフラグメントに比較して、クローン化遺伝子フラグメントは容易に大量精製できるので、配列決定段階を明瞭に読み取ることができる。プローブ配列中に1つでもミスマッチがあるとプローブは無効になるので、配列を得る際には速度よりも精度のほうが著しく優先される。

上記に要約したアプローチによりスペーサー配列を得る容易さを考慮すると、プローブが所望される生物のスペーサー領域のヌクレオチド配列を最近隣種のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較するのが、特異的プローブ配列を誘導するために好適な方法である。

最近隣種とは、DNA相同の点で最も密接に関連することが知られており且つ該当生物と区別されなければならない分類群を意味する。

該当成分の分類学的位置に依存して、最近隣種は該当生物に非常に高度の関連し、結合度が75%以上であってもよいし、関連度が低く、有効なDNA相同百分率を示さなくてもよい。初期再生レート法では結合度の値は約30%以下であり、固相DNA: DNAハイブリダイゼーション法ではDNA相同は更に低く、10~20%の結合度になる。

一方、該当生物を区別すべき最近隣種のヌクレオチド配列を入手できない場合には、試行錯誤により特異的プローブを選択することができる。その場合、スペーサー領域の任意の場所に位置し得る特異的プローブ領域を各生物毎に実験的に定義しなければならない。tRNA遺伝子やシグナル配列のようなスペーサー領域中のほんのわずかの領域しかプローブ領域として先験的に除外できない場合もある。しかしながら、16S-23SrRNAスペーサー領域は一般に小さく、通常900bp以下であるので、大規模にスクリーニングしなくても良好なプローブ配列を容易

に見いだすことができる。

例えば16S及び23SrRNA遺伝子間の700bpのスペーサー 領域の場合、tRNA及びシグナル配列を欠失させることに より得られる「短縮」スペーサー領域は約500bpであり 得る。

本明細書中に使用する「生物学的サンプル」なる用語は、該当標的配列が探査される臨床サンプル (膿、痰、血液、尿等)、環境サンプル、細菌コロニー、汚染又は純粋培養物、精製核酸等のような試料を意味する。

本明細書中に使用する「rRNA遺伝子スペーサー領域か

ら誘導」なる用語は、該当プローブがDNAフラグメントから形成されるかRNAフラグメントから形成されるかに関係なく、又はクローン化フラグメント(DNAの場合)から構成されるか又は合成オリゴヌクレオチドから構成されるかに関係なく、該当プローブがゲノム又は転写RNA分子中に通常存在するリボソームRNA遺伝子間のスペーサー領域に配置された配列とハイブリダイズすることを意味する。

Neisseria gonorrhoeae株を検出するための本発明の ハイブリダイゼーションプローブは、

## - 核酸グループ:

## グループNGI1:

CGATGCGTCG	TTATTCTACT	TCGC		NGI1
GCGAAGTAGA	ATAACGACGC	ATCG		NGIIIC
GCGAAGUAGA	AUAACGACGC	AUCG		NGITICR
CGAUGCGUCG	UUAUUCUACU	vccc		NG I 1R
グループNGI	2:			
TTCGTTTACC	TACCCGTTGA	CTAAGTAAGC	AAAC	NG 12
GTTTGCTTAC	TTAGTCAACG	GGTAGGTAAA	CGAA	NGIZIC
GUUUGCUUAC	UUAGUCAACG	G G U A G G U A A A	CGAA	NG121CR

## UUGGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC NGI2R

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修 飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズすると いう条件下で、

-・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換 されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列 を含む。

Neisseria meningitidis株を検出するための本発明 のハイブリダイゼーションプローブは、

## - 核酸グループ:

## グループNMI1:

GGTCAAGTGT	GACGTCGCCC	T G	NMI1
CAGGGCGACG	TCACACTTGA	сс	NMI1IC
CAGGGCGACG	UCACACUUGA	СС	NMI11CR
GGUCAAGUGU グループNMI	GACGUCGECC 2:	U G	NMI1R
GTTCTTGGTC	AAGTGTGACG	TC	NMI2
GACGTCACAC	TTGACCAAGA	A C	NMI2IC
GACGUCACAC	UUGACCAAGA	A C	NMIZICR
GUUCUUGGUC グループNMI	A A G U G U G A C G 3:	U C	NHI2R
GCGTTCGTTA	TAGCTATCTA	CTGTGC	EIMN
GCACAGTAGA	TAGCTATAAC	GAACGC	NWISIC
GCACAGUAGA	UAGCUAUAAC	GAACGC	NMISICR
GCGUUCGUUA グループNM	U A G C U A U C U A I 4 :	CUGUGC	REIMN
TGCGTTCGAT	ATTGCTATCT	ACTGTGCA	N M I 4
TGCACAGTAG	<b>A T A G C A A T A T</b>	CGAACGCA	NMI4IC
UGCACAGUAG	AUAGCAAUAU	CGAACGCA	NMI4ICR
UGCGUUCGAU	AUUGCUAUCU	ACUGUGCA	NMI4R

### グループ NM 15:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

NMI5

A A T G G A A C A G A A T C C A T T C A G G G C G A C G T C A C A C T T G A C C A A G A A C A A A A

NMI5IC

A A U G G A A C A G A A U C C A U U C A G G G C G A C G U C A C A C U U G A C C A A G A A C A A A

NMI5ICR

UUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCCUGAAUGGAUUCUGUUCCAUU

NMI5R

グループ NMI6:

TTTGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC NMI6

GTCTGATGTT ETAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA NMI6IC

GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA NMI6ICR

UUUGCCUAAC AUUCCGUUCA CUAGAACAUC AGAC NMJ6R から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核 ・前記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換 酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれかにおいてもプローブが対応する非 修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズする という条件下で、

-・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチド が付加もしくは除去されているか、

されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列 を含む。

Branhamella catarrhalis株を検出するための本発明 のハイブリダイゼーションプローブは、

## - 核酸グループ:

## グループ BCI1:

TTAAACATCT TACCAAAG BCI1

CTTTGGTAAG ATGTTTAA BCI1IC

CUUUGGUAAG AUGUUUAA BCI1ICR

UUAAACAUCU UACCAAAG BCI1R

グループBCI2:

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA BCI2

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA BCIZIC

UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA BCI21CR

# **UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA** から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修 飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズすると いう条件下で、

-・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

## - 核酸グループ:

グループHDI1:

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG HDI1

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA HDI11C

CAAUAUGCCU CGCGCAUAAU AA HDI1ICR

UUAUUAUGCC CCACGCAUAU UC から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核 酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修 飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズすると いう条件下で、

- ー・夫々の末端のいずれかに1丈は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換 されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列

BCI2R

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換 されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列 を含む。

Haemophilus ducreyi株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

を含む。

Haemophilus influenzae株を検出するための本発明

## - 核酸グループ:

## グループ 田田:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT HII1

AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT HIIIIC

AAGUGCGGUC AAUUUGAUGC GU HII11CR

ACGCAUCAAA UUGACCGCAC UU HIIIR

グループ [[1]2:

ACTITGAAGT GAAAACTTAA AG HII2

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT HII2IC

CHURAAGUUU UCACUUCAAA GU BIIZICR

ACUUUGAAGU GAAAACUUAA AG

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修 飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズすると いう条件下で、

-・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

## - 核酸グループ:

## グループBPI1:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT BP11

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG BPI1IC

AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG BPI1ICR

CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU

BPI1R

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修

飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

-・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチド

HII2R

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換 されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列 を含む。

Bordetella pertussis株を検出するための本発明の ハイブリダイゼーションプローブは、 が付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換 されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列

を含む。

Streptococcus pneumoniae株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

## - 核酸グループ:

## グループBPI1:

CCACACCCAT	CCTCTGGACA	GGCTT	BPI1
AAGCCTGTCC	AGAGGATGGG	TGTGG	BPI1IC
AAGCCUGUCC	AGAGGAUGGG	V G V G G	BPI1ICR
CCACACCCAU	CCUCUGGACA	<b>G G C U U</b>	BPI1R
グループSPI	[2:		
AGGAACTGCG	CATTGGTCTT		SPI2
AAGACCAATG	CGCAGTTCCT		SPIZIC
AAGACCAAUG	CGCAGUUCCU		SP121CR
AGGAACUGCG グループSPI			SPI2R
GAGTTTATGA	CTGAAAGGTC	AGAA	SPI3
TTCTGACCTT	TCAGTCATAA	ACTC	SPI3IC
UUCUGACCUU	UCAGUCAUAA	ACUC	SPIBICR

**GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA** から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修 飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズすると いう条件下で、

-・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- **SPI3R**・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列 を含む。

Streptococcus agalactiae株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

## - 核酸グループ:

## グループSAI1:

AATCGAAAGG	TTCAAATTGT	Т	SAII
AACAATTTGA	ACCTTTCGAT	T	SAIIIC
A A C A A U U U G A	ACCUUUCGAU	V	SAIIICR
AAUCGAAAGG	UUCAAAUUGU	U	SAIIR
グループ 5 1 1 2:			
GGAAACCTGC	CATTTGCGTC	TT	SAIZ
AAGACGCAAA	TGGCAGGTTT	cc	SAIZIC
AAGACGCAAA	UGGCAGGUUU	CC	SAIZICR
GGAAACCUGC	CAUUUGCGUC	បប	SAI2R
グループ 5 13:			
TCCACGATCT	AGAAATAGAT	TGTAGAA	8118
TTCTACAATC	TATTTCTAGÁ	TCGTGGA	SAISIC
UUCUACAAUC	UAUUUCUAGA	UCGUGGA	SAIBICR
UCCACGAUCU グループSAI		UGUAGAA	SAI3R
TCTAGTTTTA	AAGAAACTAG	GTT	S A 1 4
AACCTAGTTT	CTTTAAAACT	A G A	SAI4IC
AACCUAGUUU	C U U U A A A A C U	A G A	SAI4ICR

**UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUU** から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修

**SAI4R** 飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズすると いう条件下で、

-・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチド

が付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換 されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列 を含む。

本発明は更に、適切な条件でプローブがCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及び/又はRNAと特異的にハイブリダイズするという条件下で、図10に示し16S-23SrRNAスペーサー配列から誘導される15〜最大数のヌクレオチドの配列、又はTがUで置換された対応配列、又はその相補配列、又はTがUで置換された対応する相補配列を含むCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのハイブリダイゼーションプローブに係る。

グループNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4に示した配列中、アルファベットは以下のヌクレオチドを表す。

A:アデニル残基

C:シチジル残基

G: グアニジル残基

T:チミジル残基

U:ウラシル残基。

「標的」なる用語は、上記に定義したグループNGI1,NGI2,NMI1,NMI2,NMI3,NMI4,NMI5,NMI6,BCI1,BCI2,HDI1,HI11,HI12,BPI1,SPI1,SPI2,SPI3,SAI1,SAI2,SAI3及びSAI4の配列のいずれかに相補的な配列を意味する。

本発明のプローブが上記配列の片側又は両側に核酸延長部(例えばクローニングベクターの核酸フラグメント又は該クローニングベクターから前記プローブを切断することにより得られるリンカーフラグメント)を含む場合、このような延長部は、追って定義するような本発明の方法により試験され得る微生物のDNA中で上記標的以外の任意の対応する相補的核酸配列とハイブリダイズしないように選択されるべきである。このようなハイブリダイゼーションは寄生性であり、プローブの特異性を低下させる。好適プローブは、上記グループの配列のいずれかから形成される核酸フラグメントから構成され、該フラグメントは15~該当核酸配列の最大数のヌクレオチドを含む。

上記ヌクレオチド配列(及び以下に記載する他の配列)において、式の左端は常に該当配列の5<sup>1</sup>未満に対応し、右端は3<sup>1</sup>末端に対応する。

更に「グループXのプローブ」(XはNGI1, NGI2, NMI 1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII 2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4から選択される)と称するとき、このようなプローブは上記又は下記に定義するグループに属する核酸の1種に含まれる配列を有するものと理解されたい。

また、本明細書中で使用する「ヌクレオチド」なる用

語は、特に明記しない限りリボヌクレオチド及びデオキシヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド(例えばイノシン)を無差別に意味するものと理解されたい。「ヌクレオチド」なる用語は更に、修飾基(例えばハイブリダイゼーション能に根本的に影響しない化学的修飾基)を含むヌクレオチドも包含する。このような修飾基の目的は、例えば特に該当RNA又はDNA鎖(例えば他のDNA及び/又はRNAと共に生物学的サンプル中に最初に含まれているRNA又はDNA鎖)とのハイブリダイゼーション産物中から標識又はラベルされたプローブを後で検出するために適切なマーカー又はラベルと直接又は間接的に結合し易くすることである。

例えば、このような修飾基は、適切な酵素又は蛍光又 は化学発光ラベルを担持する他の抗体により特異的に認 識され得る抗体により認識可能である。可能な標識手順 については追って詳細に説明する。

本発明は更に、上記配列のいずれかを有しており且つ上記プローブの特異性を変更しないように一部のヌクレオチドが置換したプローブにも係る。プローブは、上記グループのいずれかに属する核酸の1種又はその一部から構成される場合もあるが、その場合、プローブはNeis seria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branham ella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus

influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の遺伝材料に対する該プローブとの特異性を変えない程度までその両側にヌクレオチド延長部を含む。

従って本発明は、場合によりヌクレオチド配列に少数 の些少の変異を有するほとんどのNeisseria gonorrhoe ae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhali s, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bor detella pertussis, Streptococcus agalactiae, Strep tococcus pneumoniaeもしくはCampylobacter jejuni 及びCampylobacter coliのRNA又はDNAに含まれる配列 のヌクレオチド配列からなるレプリカ(数字の数にIC又 はICRと記述することにより表す)、又はNeisseria go norrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella cat arrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influen zae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactia e, Streptococcus pneumoniaeもしくはCampylobacter je juni及びCampylobacter coliの天然RNA又はDNAに含 まれる配列に相補的な配列(数字のみ又は数字の後にR を記述することにより表す)から形成されるプローブを 提供する。

より詳細には、該当DNA中の標的配列は、このような標的に対する本発明のプローブのハイブリダイゼーション特異性に影響しないように、場合により株間に些少な天然の変異を有するNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilu

s ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella per tussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pn eumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の全部ではないとしても大部分に存在する以下 の連続配列のいずれかから構成される。 Neisseria gonorrhoeaeの場合、

## GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA.

Neisseria meningitidisの場合、

CAGGGCGACG TCACACTTGA CC

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC

TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA

A A T G G A A C A G A A T C C A T T E A G G G C G A C G T C A C A E T T G A E C A G A A C A A A A

CTTTGGTAAG ATGTTTAA

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA.

Haemophilus ducreyiの場合、

Bordetella pertussisの場合、

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA.

ANGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG.

Haemophilus influenzaeの場合、

Streptococcus agalactiaeの場合、

ANGTGCGGTC ANTTTGATGC GT

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT.

Streptococcus pneumoniaeの場合、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

ANGACCANTG CGCAGTTCCT

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC.

### AACAATTIGA ACCTTTCGAT T

## AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC

## TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA

## ANCCTAGTTT CTTTAAAACT AGA.

本発明のプローブは、対応するヌクレオチド配列を含むインサートを含む組換プラスミドをクローニングし、必要に応じて適切なヌクレアーゼを使用してクローン化プラスミドから対応するヌクレアーゼ配列を切断し、例えば分子量に従う分画により回収することにより形成され得る。本発明のプローブは、例えば従来のホスホートリエステル法により化学的に合成することもできる。

本発明は更に、生物学的サンプル中でNeisseria gon orrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella cata rrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenz ae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactia e, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jeju ni及びCampylobacter coli株を検出するための方法にも係り、該方法は、必要に応じて適切な変性条件下で核酸(DNA又はRNA)をハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブととサンプル中に存在し得る株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプローブと接触させる段階と、ハイブリッドが形成された場合にはこれを検出する段階とを含む。

本発明の方法は、該当生物を探査するサンプル中に存在する可能性のある酵母、真菌、原生動物、他の細菌株及び/又はヒト細胞から、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliを、区別することができる。本発明の方法は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をサンプル中で直接又は株を培養後に検出する方法に係る。

ハイブリッドが検出された場合、グループNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4のプローブのいずれかの使用中に夫々Neisseria gonorrh oeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrha lis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, B ordetella pertussis, Streptococcus agalactiae及び

Streptococcus pneumoniaeによる感染が生物学的サンプル中に存在していたと判断することができる。

本発明の有利な実施態様によると、Neisseria gonor rhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarr halis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenza e, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法において、使用されるプローブは、生物学的サンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningit idis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducrey i, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA全体及びRNAとハイブリダイズするプローブである。

ハイブリダイゼーション条件は、例えばハイブリダイゼーション温度、媒体の成分の性質及び濃度、並びに形成されるハイブリッドの洗浄温度等の数個のパラメーターに依存して監視され得る。

ハイブリダイゼーション及び洗浄温度はプローブ(その核酸組成、種類及び長さ)に応じて上限を制限され、本発明のプローブの最高ハイブリダイゼーション又は洗浄温度は約30~58℃である。温度がこれ以上になると、デュプレクシングはプローブと標的との間に形成されるハイブリッドの解離(又は変性)に競合する。

好適ハイブリダイゼーション媒体は約3×SSC (1×S SC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有する。

好適洗浄媒体は、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1 及び20%脱イオンホルムアミドを含有する。他のハイブ リダイゼーション又は洗浄媒体も使用できる。

しかしながら、プローブ又は媒体に変更を導入する場合、必要な特異性を得るためにプローブを使用可能な温度は、B.D.HAMES and S.J.HIGGINS, (eds.), Nucleic acid kydridization. A practical approach, IRL Press, Oxford, U.K., 1985に記載されているような既知の関係に応じて変更すべきである。

この点では、一般にDNA: DNAハイブリッドはRNA: DNA又はRNA: RNAハイブリッドよりも安定性が低いことにも留意すべきである。従って、検出すべきハイブリッドの性質に依存して、特異的検出を実施できるようにハイブリダイゼーション条件を適応させるべきである。

本発明に従って、一般にNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haem ophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法は、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値にハイブリダイゼーション温度を適宜調節することにより実施され得る。このような場合、より厳密な条件で洗浄する必要はない。

本発明の別の実施態様によると、ハイブリダイゼーション温度を必ずしもハイブリダイゼーションが特異的となるような値に調節する必要はなく、特に、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値に対応する温度で洗浄を実施するのであるならば、ハイブリダイゼーションが特異的となるような温度よりも低い温度でハイブリダイゼーションを行ってもよい。

グループNGI1のプローブでNeisseria gonorrhoeae株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNGI2のプローブでNeisseria gonorrhoeae株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI1のプローブでNeisseria meningitidis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループNMI2のプローブでNeisseria meningitidis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループNMI3のプローブでNeisseria meningitidis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループNMI4のプローブでNeisseria meningitidis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約48℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループNMI5のプローブでNeisseria meningitidis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約58℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI6のプローブでNeisseria meningitidis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループBCI1のプローブでBranhamella catarrhalis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約30℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループBCI2のプローブでBranhamella catarrhalis 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約42℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループBPI1のプローブでBordetella pertussis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHDI1のプローブでHaemophilus ducreyi株を 検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の 実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は 洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記 に定義した類である。

グループHII1のプローブでHaemophilus influenzae 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループHII2のプローブでHaemophilus influenzae 株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方 法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/ 又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は 上記に定義した類である。

グループSAI1のプローブでStreptococcus agalactia e株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI2のプローブでStreptococcus agalactia e株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体

は上記に定義した類である。

グループSAI3のプローブでStreptococcus agalactia e株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI4のプローブでStreptococcus agalactia e株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約37℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI1のプローブでStreptococcus pneumonia e株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI2のプローブでStreptococcus pneumonia e株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI3のプローブでStreptococcus pneumonia e株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

本発明は更にNeisseria meningitidis株を特異的に 検出するためのキットに係り、該キットは、

- -Neisseria meningitidisに特異的なプローブ、即ちグループNMI1, NMI12, NMI3, NMI4, NMI5又はNMI6のプローブと
- これらのプローブとNeisseria meningitidis株のDNA 及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にNeisseria gonorrhoeae株を特異的に検 出するためのキットに係り、該キットは、

- -Neisseria gonorrhoeaeに特異的なプローブ、即ちグループNGI1又はNGI2のプローブと、
- ーこれらのプローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA 及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反 応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成 するために必要な成分と、
- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にBranhamella catarrhalis株を特異的に 検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記Branhamella catarrhalisに特異的なプローブか

ら選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループ BCI1又はBCI2のプローブと、

ーこれらのプローブとBranhamella catarrhalis株のDN A及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にHaemophilus ducreyi株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- ー上記Haemophilus ducreyiに特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループHDI1のプローブと、
- ーこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にBordetella pertussis株を特異的に検 出するためのキットに係り、該キットは、

- ー上記Bordetella pertussisに特異的なプローブから 選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループBP 11のプローブと、
- ーこれらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及 び/又はRNAのみとの間にハイブリダイベーション反応 を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にHaemophilus influenzae株を特異的に 検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記Haemophilus influenzaeに特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループHII1又はHII2のプローブと、
- ーこれらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA 及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反 応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成 するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にStreptococcus agalactiae株を特異的 に検出するためのキットに係り、該キットは、

- ー上記Streptococcus agalactiaeに特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループSAI1, SAI2, SAI3又はSAI4のプローブと、
- ーこれらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にStreptococcus pneumoniae株を特異的 に検出するためのキットに係り、該キットは、

- ー上記Streptococcus pneumoniaeに特異的なプローブ から選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループSPI1、SPI2又はSPI3のプローブと、
- ーこれらのプローブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション 反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にCampylobacter jejuni及びCampylobact er coli株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli に特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブと、
- これらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を応じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- -前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のプローブは、核酸プローブを利用するアッセイの特異性を増加するサンドイッチハイブリダイゼーションシステムで使用することができる。核酸プローブに基づくアッセイにおけるサンドイッチハイブリダイゼーションの原理及び使用は更に記載されている(例えばDUNN and HASSEL, Cell, 12:23-36;1977;RANKI et a 1., Gene, 21:77-85;1983)。直接ハイブリダイゼーションアッセイは好ましい速度を有するが、サンドイッチハイブリダイゼーションは信号対雑音比が高いという点で有利である。更に、サンドイッチハイブリダイゼーションは核酸プローブに基づくアッセイの特異性を増加することができる。

適正に設計するならば、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは実際に、同一生物の2種の異なる核酸部分を認識する2種のプローブを使用する場合、核酸プローブに基づく試験の特異性を最大にすることができる。満足しなければならない唯一の要件は、2種のプローブの両方が(i)標的生物の同一核酸分子にハイブリダイズし、且つ(ii)同一の非標的生物にハイブリダイズしないことである。

2種の所与のプローブ I 及びIIを使用する場合、サンドイッチハイブリダイゼーションシステムは次のように説明することができる。

プローブ I は生物(Cでなく)A及びB由来の核酸と ハイブリダイズする。 プローブIIは生物(Bでなく)A及びC由来の核酸と ハイブリダイズする。

両方のプローブが標的核酸にハイブリダイズすることが絶対的に必要であるので、生物A由来の核酸がサンプル中に存在する場合のみに検出可能なシグナルが発生される。プローブの一方が検出すべき生物に特異的である場合には、他方のプローブは第1のプローブよりも同一標的分子にハイブリダイズするのであれば、特異的配列から構成してもまい。

本発明のプローブは、同一標的分子にハイブリダイズする別の非特異的又は特異的プローブと夫々組み合わせてNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliに特異的なサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイで使用することができる。サンドイッチハイブリダイゼーションプロセスでは、標的DNA及はRNAを探査する生物学的サンプルにプローブを同時に加えてもよいし、別々に加えてもよい。

本発明は更に生物学的サンプル中でNeisseria gonor rhoeae株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がNeisse ria gonorrhoeaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、
- これらのプローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でNeisseria menin gitidis株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がNeisse ria meningitidisに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、
- ーこれらのプローブとNeisseria meningitidis株のDNA 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を 生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成する ために必要な成分と、
- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でBranhamella cat arrhalis株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キッ

トは、

-同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がBran hamella catarrhalisに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

-これらのプローブとBranhamella catarrhalis株のDN A及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でHaemophilus duc reyi株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キット

-同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がHaemop hilus ducreyiに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でHaemophilus inf luenzae株をin vitoro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がHaemop hilus influenzaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でBordetella pert ussis株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がBordet ella pertussisに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でStreptococcus a

galactiae株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

-同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がStrept ococcus agalactiaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でStreptococcus p neumoniae株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは

-同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がStrept ococcus pneumoniaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でCampylobacter j ejuni株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がCampylobacter jejuniに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブとCampylobacter jejuni株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でCampylobacter c oli株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、一同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がCampyl obacter coliに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとCampylobacter coli株のDNA及び /又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じ させることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するため に必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。 本発明のプローブは、コンペティションハイブリダイゼーションプロトコルでも使用することができる。

コンペティションハイブリダイゼーションでは、標的 分子は特異的プローブとその補体との間に形成されるハイブリッドに競合する。標的数が多ければ多いほどプローブとその補体との間に形成されるハイブリッドの量は少なくなる。特異的標的が存在していたことを示す陽性シクナルは、標的を加えなかったシステムに比較してハイブリダイゼーション反応が低いことにより確認される。特定の実施態様によると、適切に標識した特異的オリゴヌクレオチドプローブを標的分子とハイブリダイズさせる。次に、混合物を受容器(例えばマイクロタイター皿のウェル)に移し、特異的プローブに相補的なオリゴヌクレオチドを固定し、ハイブリダイゼーションを続ける。洗浄後、相補的オリゴヌクレオチドとプローブとの間に形成されたハイブリッドを、使用したラベルに応じて好ましくは定量的に測定する。

本発明のオリゴヌクレオチドは、酵素的に増幅した特異的フラグメントを生成するためにポリメラーゼ鎖反応技術 (PCR; Mullis and Faloona, Methods in Enzymo logy 155:335-350, 1987) で増幅プライマーとして及び/又は夾叉オリゴヌクレオチドプライマー間で増幅されたフラグメントを検出するためのプローブとして使用することができる。

PCRによるハイブリダイゼーションアッセイの特異性は種々のレベルに調節することができる。

増幅法又は検出法又はその両方は特異的であり得る。 両方が特異的な場合は特異性が最大になるので好適であ る。このようなPCRを利用する高特異性試験は本発明の プローブを使用して実施され得る。

しかしながら、場合によっては、多様な生物に使用できるように増幅法を標準化するために、特異的検出に結び付けられた本発明の検出プローブを夾叉する保存性プライマーを使用する非特異的増幅法が有利である。

標準化増幅法で使用される増幅プライマーは、スペーサー領域の両側の16S及び23SrRNA遺伝子の保存領域に見いだされる(実施例1参照)。

本発明は更に、検出すべき微生物に特異的な本発明のプローブのいずれかを使用して生物学的サンプルに含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するための方法にも係り、該方法によると、好ましくはプローブ領域を夾叉する少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する(標的配列を含む)DNA及び/又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のプローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生成物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出する。

増幅が必要な場合、その目的は標的配列を増幅し(それによって標的配列の夾叉領域も増幅させ)、増幅領域のみを標識することである。

生物学的サンプル中に十分な標的配列が存在する場合、増幅は不要である。

このような場合、ハイブリダイゼーション前に例えば 化学的手段により又は特異的染料の添加により標識を実 施するべきであり、生物学的サンプル中に存在するDNA 及び/又はRNA全体を標識することに留意すべきであ る

本発明は更に、生物学的サンプル中に含まれる1種の 微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するた めのキットに係り、該キットは、

- ー検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした本発明のプローブの少なくとも1種と、
- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
- -酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブ と検出すべき微生物のDNA及び/又はRNAとの間にハイブ リダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液 又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

上記方法及びキットは、Saiki et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234, 1989) により記載されている逆ドットブロットアッセイのような逆ハイブリダイゼーションドットブロットアッセイを含む。

この場合、5′ビオチニル化プライマーを用いるPCRを使用して標的配列をまず酵素的に増幅する。第2段階では、固体支持体に固定した特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション後、増幅産物を検出する。この方法は実施例2に記載する変形方法のような数種の変形が考えられる。例えば、この方法はスペーサー領域を夾叉する普遍的プライマーを用いるPCR、及び該当生物の種々の特異的オリゴヌクレオチドプライマーをドットスポットした膜とのハイブリダイゼーション後に特定の臨床サンプル中に存在し得る種々の微生物の同時且つ特異的検出に特に有利であり得る。上記のような逆ハイブリダイゼーションアッセイで使用可能な特異的オリゴヌクレオチドプライマーの有利なパネルの例を以下に挙げる。

- (i) 痰パネル:Moraxella (Branhamella) catarrhalis Streptococcus pneumoniae
  - Haemophilus influenzea
- (ii) CSFーパネル:Neisseria meningitidis Haemophilus influenzae Streptococcus pneumonoiae
- (iii) 尿生殖ーパネル:Neisseria gonorrhoese Haemophilus ducreyi Chelmydia trachomatis

### Treponema pallidum

当然のことながら、これらのパネルは他の臨床的に関連する微生物のプローブを加えることにより拡張することができる。歯周ポケットからのサンプル又は血液サンプルのような他の臨床サンプルのパネルも利用できる。

PCRには、非普遍的に保存されたプライマー、例えばスペーサー領域自体に配置されたプライマーも使用することができ、PCRは1組のプライマー用いて又は同一反応容器で種々の組のプライマーを用いて実施することができる。

増幅段階なしに逆ハイルイダイゼーションを実施する こともできる。この場合、サンプル中に存在する核酸を ハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段又は特異 的染料の添加により特異的又は非特異的に標識又は修飾 すべきである。

ほとんどの場合、スペーサー領域から誘導され得る該 当生物の特異的プローブの数は、本明細書に記載するプローブに制限されない。

生物によっては、種々の細菌の高特異性且つ高感度のプローブの開発のためにスペーサー領域を利用できることが立証されているプローブは1又は2種しか記載されていない。Bordetella pertussisのみが例外であり、スペーサー領域の唯一の特定領域(Bordetella pertussis配列中のヌクレオチド271~299、図2の上段)が特異的配列を有する。しかしながら、Bordetella pertussisのスペーサー領域配列から、高度に関連するBordetella種の同時検出に有用であり得るプレーブを設計することができる。Bordetella pertussis以外のBordetella種を検出するプレーブも図2の配列から推定することができる。同様に、Moraxella nonliquefaciens及びHaemophilus influenzaeバイオグループaegyptiusの潜在的に特異的なプローブも夫々図7及び8に示すスペーサー配列から推定することができる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeis seria gonorrhoese株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

- ー固体支持体に固定されたNeisseria gonorrhoeaeに特 異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少な くとも1種のプローブと、
- -該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
- ー酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとNe isseria gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeis seria meningitidis株をin vitro検出するためのキットの係り、該キットは、

ー固体支持体に固定されたNeisseria meningitidisに 特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとNe isseria meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間に ハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な 緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、 - 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaem ophilus ducreyi株をin vitro検出するためのキットの係り、該キットは、

ー固体支持体に固体されたHaemophilus ducreyiに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとHa emophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBran hamella catarrhalis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

- 固体支持体に固定されたBranhamella catarrhalisに 特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少 なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとBr anhamella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBord etella pertussis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

ー固体支持体に固定されたBordetella pertussisに特 異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少な くとも1種のプローブと、

- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩

衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaem ophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

ー固体支持体に固定されたHaemophilus influenzaeに 特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少 なくとも1種のプローブと、

- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとHa emophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間に ハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な 緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStre ptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

ー固体支持体に固定されたStreptococcus pneumoniae に特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとSt reptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStre ptococcus agalactiae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

ー固体支持体に固定されたStreptococcus agalactiae に特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された 少なくとも 1 種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとSt reptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のCamp ylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vi tro検出するためのキットに係り、該キットは、

ー固体支持体に固定されたCampylobacter jejuniに特 異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少な くとも1種のプローブと及びCampylobacter coliに特 異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少な くとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素 的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブ リッドを適時検出するための手段とを含む。

### プローブの使用条件

本発明のプローブは標識すると有利である。任意の従来のラベルを使用することができる。プローブは、 $^{32}$ P、 $^{35}$ S、 $^{125}$ I、 $^{3}$ H及び $^{14}$ Cのような放射性トレーサーにより標識され得る。

放射性標識は、(標識すべき末端に応じて)放射性標識ヌクレオチド、(ホスファターゼによる脱リン酸化を伴うか又は伴わない)ポリヌクレオチドキナーゼ、末端転移酵素又はリガーゼを使用することにより、3′又は5′位の末端標識のような任意の従来方法に従って実施され得る。本発明のプローブの1種は、数種の放射性ヌクレオチド又は数種の放射性及び非放射性ヌクレオチドから構成される鎖の合成用マトリックスであり得る。

本発明のプローブは、1又は数種の放射性ヌクレオチドを使用する化学的合成により製造することもできる。 別の放射性標識方法は本発明のプローブの化学的ヨウ素化であり、プローブに数個の<sup>125</sup>I原子を結合させる。

本発明のプローブの1種が非放射性RNA又はDNAとのハイブリダイゼーションに使用するように放射性標識される場合、ハイブリダイゼーションの検出方法は、使用される放射性トレーサーに依存する。一般に、放射性トレーサーにより発生される電離性放射線を検出することが可能なオートラジオグラフィー、液体シンチレーション、γ計数又は他の任意の従来方法を使用することができる。

免疫特性(例えば抗原又はハプテン)、ある種の試薬に対する特異的親和性(例えばリガンド)、検出可能な酵素反応を提供する特性(例えば酵素、補酵素、酵素基質又は酵素反応に関与する基質)、又は物理的特性(例えば任意の波長の光の蛍光、発光又は吸収)を有する残基に本発明のプローブを組み合わせることにより非放射性標識を使用することもできる。プローブと標的とにより形成されるハイブリッドを特異的に検出する抗体も使用できる。

本発明のプローブを化学的に合成する場合には非放射性ラベルを使用することができ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン及びウラシル残基は、プローブ又はプローブと相補的DNAもしくはRNAフラグメントとの

間に形成されたハイブリッドを検出することが可能な他 の化学的残基に結合し得る。

一方、1種以上のヌクレオチドを他の化学的残基に結合することにより修飾した場合、プローブのヌクレオチド配列は本発明のプローブの1種のヌクレオチド配列と同一である。

本発明は更に、上記のように標識され且つ検出可能な本発明のプローブを使用してハイブリダイゼーションによりRNA及び/又はDNAを検出するための方法にも係る。この点では、従来のハイブリダイゼーション方法を使用することができる。

生存生物起源の細胞又はそれ自体生存生物である細胞 を検出するためには、化学的又は物理的方法を使用して 細胞の部分的又は全溶解によりこれらの細胞のRNA及び /又はDNAに必要に応じてアクセスできるようにし、検 出可能な本発明の1又は数種のプローブと接触させる。 この接触は、液体媒体又は溶液中でニトロセルロース、 セルロース又はナイロンフィルターのような適当な支持 体上で実施され得る。この接触は、次善、最適又は制限 条件(即ち配列が所定の分子長で完全に相同である場合 のみにハイブリッド形成可能な条件) 下で実施され得 る。このような条件は、温度、反応物質濃度、最適核酸 対合温度を低下させる物質の存在(例えばホルムアミ ド、ジメチルスルホキシド及び尿素)、及び反応容量を 外見上低下させるか及び/又はハイブリッド形成を促進 する物質の存在(例えばデキストラン硫酸、ポリエチレ ングリコール又はフェノール)を含む。

ハイブリダイズしなかった本発明のプローブを除去するには、適切なイオンカ価及び適切な温度の緩衝溶液で洗浄し、場合により、S1ヌルレアーゼ又は一本鎖DNAもしくはRNAを消化するが、DNA-RNAハイブリッドもしくは二本鎖DNAを消化しない他の任意の酵素で処理する。

液体媒体中で、細胞DNA又はRANフラグメントに対合した本発明のプローブのハイブリッドは種々の方法、例えばヒドロキシアパタイト上のクロマトグラフィーにより液体媒体の残余から分離することもできる。

次に、ハイブリダイズしたプローブをプローブ上のラベルにより検出する。

染色体DNAフラグメントを標的にするためには、RNAを 1又は数種の酵素で処理し、DNAフラグメントを変性

(即ち両鎖を分離)した後、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプローブの1種をDNAフラグメントと接触させ、ハイブリダイゼーションの終了に達するために必要な時間後、ハイブリダイズしなかったフラグメントをハイブリダイズしたフラグメントから分離し、細胞検出について上述したようにラベルを検出する。

一般に、異種DNAの存在が該当用途でプローブの特異性を損なわないならば、クローニングを可能にする組換DNA中に本発明の種々のプローブを含むこともできる。

図  $1 \sim 2010$ には、種々の微生物中で発見されたスペーサー領域のアライメント(全部または一部を配列したもの)が例として示されている。対 (match) 及び空所 (g ap) は各々、":"及び"一"で表されている。総ての配列に関して、非ーコードストランドは、その5'-3'配列で示されている。

5′末端は、16S rRNA遺伝子の近位であり、3′末端は、23S rRNA遺伝子の近位である。

図  $1 \sim 2010$ に参照される各生体(E. coliの 1 種を除く)の $168 \ge 238$  rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の各核酸配列は、新規であることは指摘されねばならない。

図1には、Neisseria gonorrhoeae組NCTC 8375 (上列) 及びITM 4367 (下列) の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の16S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

図 2 には、Bordetella pertussis ATCC 10380 (上列) 及びBordetella bronchiseptica NCTC 452 (下列) の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図3には、Neisseria meningitidis NCTC 10025 (上列) 及びNeisseria gonorrhoeae NCTC 8375 (下列) の1 6Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図4には、Neisseria gonorrhoeae NCTC 8375 (上例)及びBordetella pertussis ATCC 10380 (下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図5には、Branhamella catarrhalis ITM 4197 (上列) 及びNeisseria gonorrhoeae NCTC 8375 (下列) の1 6Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図6には、Haemophilus ducreyi CIP 542 (上列) 及びEscherichia coli (下列) の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図7には、Branhamella catarrhalis ITM 4197 (上列) 及びMoraxella nonliquefaciens ATCC 19975 (下列) の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図8には、Haemophilus influenzae(バイオグループ influenzae)NCTC 8143(上列)及びHaemophilus influenzae(バイオグループaegyptius)ITM 859(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図9には、Streptococcus pneumoniae S90-5122 (上列) 及びStreptococcus agalactiae U90-2817 (下列) の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図10には、Campylobacter jejuni ATCC 33560 (上

列)及びCampylobacter coli ATCC 33559 (下列) の16S と23S rRNAとの間のスペーサー領域の23S rRNA近位端の 核酸配列アライメントが示されている。

使用した株は、各々培地コレクション:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, M D, USA.

CIP:Collection de l' Institut Pasteur, Paris, Franc

ITM:Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgiu

NCTC:National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, United Kingsom. から入手し得る。

以下の実施例は、本発明のプローブの製造法及び種々のハイブリダイゼーションプロトコルを使用するプローブの特異性及び感度に関する実験結果に関する。臨床に適当な以下の生体:Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Branhamella catarrhalis、Haemophilus ducreyi、Haemophilus influenzae及びBordetella pertussisを選択した。

実施例は、種一特異性で感度の高いプローブが、研究した総ての生体のスペーサー領域に容易に知見されたことを示している。さらに、種一特異性で感度の高いプローブが16S及びまたは23S rRNA分子に知見されない生体のこの領域からプローブが構築され得ることを示している。使用した方法は、他に記載しない限り、ROSSAUらのJ. Gen. Microbiol.;135:1735-1745,1989または欧州特許出願第8940/045.3に記載の方法と本質的に同一である。rRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法及び逆ハイブリダイゼーションを除く総ての方法は現在当業者に公知である。16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるrRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法は、Perkin Elmer Cetusの"Gene Amp"キットに推薦される方法に従って実施したポリメラーゼ鎖反応法(PCR)により得られた。rRNA分子中に保存されたまたは半分保存された(semi-cons

erved) 領域に対応するヌクレオチドをPCRプライマーと して使用した。逆ドットーブロット法の原理及びプロト コルは、Saikiら(1989)により記載されている。 実施例1

Neisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeae の両方は、各々髄膜炎及び淋疾に関連する重要なヒト病原体である。これらの生体は非常に密接に関連しており、互い及び他のNeisseria種との差別化は間違い易い。Neisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeaeに特異的なDNAプローブは、両方のNeisseria種の間の正しい差別化を速め且つ臨床サンプル中でこれらの種を直接検出するために使用し得る。

Neisseria gonorrhoeaeを検出するために多くのDNAプローブについて記載されてきた(欧州特許出願第0272 0 09号及び同第0337 896号;URDEAら,Clin.Chem.35:1571-1575,1989;TOTTENら,J.Infect.Dis.148:462-471,1989;DONEGANら,Mol.Cell.Probes 3;13-26,1989;KOLBERGら,Mol.Cell.Probes 3:59-72,1989)。しかしながら、これらのプローブの内の幾つかは、非一Neisseria gonorrhoeae株と交差するか、感度が高くないことが知見された。これらのプローブは総て16S-23S rRNAスペーサー領域由来ではなかった。

Neisseria meningitidis株を検出するDNAプローブも報告された (KOLBERGら, Mol. Cell. Probes 3:59-72, 1989)。 Neisseria gonorrhoeaeのピリン遺伝子から誘導されたこのプローブも、Neisseria meningitidisに関して非常に特異性でもなく感度も高くはなかった。

Neisseria gonorrhoeae及びNeisseria meningitidis型株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列を、スペーサー領域を広げるPCRフラグメント由来のクローン化した物質を使用して決定した。図3に示されている両方の列から、幾つかの潜在的なプローブ配列が明らかになった。

約60塩基対の予想外の挿入配列を、Neisseria mening itidis株のスペーサー領域中に検出した。以下の配列:

## GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG NNI 1

### GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC NMI2

を有するオリゴヌクレオチドを、この挿入した配列から 誘導した。

(図3のNeisseria meningitidis配列の塩基対365~386 由来の)スペーサー領域のもう1つのエリアでも、Neis seria meningitidisとNeisseria gonorrhoeaeとの間で かなりの度合いで食い違いが明らかになった。このエリアから、2種類のオリゴヌクレオチドプローブ (Neisse ria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeaeの検出用のNMI3及びNGI1):

# GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC NNI3

### CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC NGI1

が化学的に合成された。

これらのヌクレオチドを、ポリヌクレオチドキナーゼ

を使用してその5′末端を<sup>32</sup>Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してその3′末端で

ジゴキシゲニル化したUTPと結合して、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、種々の位置由来の多くのNeisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeae株由来のドットースポットした変性ゲノムDNA及び他の細菌(bacterial taxa)由来の幾つかの株を使用した。

ハイブリダイゼーションー混合物は、 $3 \times SSC$ 、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド (20%, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン (0.02%, <math>w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02%, v/v)及びシェアをかけて変性したサケ精液v/vDのようか、またはv/v/vSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, v/v/v/vDを使

用し且つホルムアミドを20% (v/v) まで添加した以外には、非一放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer Mannheim製) のプロトコルシートの溶液であった。洗浄液は、 $3 \times SSC$ 、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。

ハイブリダイゼーションの結果は、以下の表にまとめられている。各プローブ毎のハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、括弧内に示されている。試験した総てのプローブは、Neisseria gonorrhoeae(プローブNGI1)またはNeisseria menigitidis(プローブNMI1,NMI2及びNMI3)に対し非常に特異性で且つ感度が高かったことが証明された。

	陽 性 株 数 / 試 験 株 数				
	NMII	NMI2	NMI3	NGI1	
<u>分 類</u>	(45°C)	(45°C)	(40°C)	(50°C)	
Neisseria meningitidis	52/53	10/11	56/56	0/11	
Neisseria sp ATCC 43831	1/1	1/1	1/1	0/11	
Neisseria gonorrhoeae	0/16	0/9	0/10	10/10	
Neisseria polysaccharea	0/3	-,-	0/3	0/3	
Neisseria lactamica	0/10	•	0/10	0/10	
Neisseria cinerea	0/4	•	0/4	2/4	
Neisseria mucosa	0/3	_	0/3	0/3	
Neisseria macacae	0/1	-	0/1	0/1	
Neisseria flavescens	0/1		0/1	0/1	
Neisseria subflava	0/2	-	0/2	0/2	
Neisseria sicca	0/1	-	0/1	0/2	
Neisseria elongata	0/2	_	0/2	0/1	
Neisseria canis	0/1	_	0/1	0/1	
Neisseria animalis	0/1	•	0/1	0/1	
Neisseria denitrificans	0/1	-	0/1	0/1	
Neisseria sp	0/5	_	0/4	0/3	
CDC group M-5	0/1	_	0/1	0/1	
CDC group EF-4a	0/1	-	0/1	0/1	
Kingella denitrificans	0/2	_	0/1	0/1	
Kingella kingae	0/1	-	0/1	0/1	
Simonsiella muelleri	0/1	-	0/1	0/1	
Simonsiella crassa	0/1		0/1	0/1	
Simonsiella steedae	0/1		0/1	0/1	
Simonsiella sp	0/1	-	0/1	0/1	
Alvsiella filiformis	0/1	-	0/1	0/1	
Eikenella corrodens	0/2	•	0/2	0/2	
Chromobacterium violaceum	0/1	-	0/1	0/1	
lodobacter fluviatile	0/1	-	0/1	0/1	
Aquaspirilum dispar	0/1	-	0/1	0/1	
Comamonas testosteroni	0/1	-	0/1	0/1	
Haemophilus influenzae	0/1	-	-	-	
Haemophilus ducrevi	0/1	-	0/1	0/1	
Kingelia indologenes	0/1	-	0/1	0/1	
Moraxella lacunata	0/1	-	-	•	
Moraxella nonliquefaciens	0/1	~	•	•	
Moraxella catarrhalis	0/3	-	0/2	0/2	
Moraxella cuniculi	0/1	-	*	, <u>-</u>	
Moraxella caviae	0/1	-	•	•	
Moraxella ovis	0/1	-	•	-	
Moraxella osloensis	0/1	-	-	-	
Escherichia coli	0/1	0/1	0/1	0/1	

NMI3及UNGI3で検出する特異性を、16S rRNA遺伝子の いる以下の増幅プライマー:

TGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

AP16

<sup>3&#</sup>x27; 末端及び23S rRNA遺伝子の5' 末端に各々配置して

### AP23

## CAC GTC CTTCGTCGCCT

とのスペーサー領域の酵素的増幅後においてもチェックした。Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Haemophilus ducreyi、Bordetella pertussis及びBranhamella catarrhalisの株由来のゲノムDNAの100ナノグラムをPCR反応に使用した。増幅後、収量の1/10をアガロースゲルに装填し、電気泳動させ、ナイロン膜上にブロットした。

続いてこの膜をプローブNGI1及びNMI3でハイブリダイズした。

各々NGI1またはNMI3をプローブとして使用したとき、Neisseria gonorrhoeaeまたはNeisseria meningitidis 物質が存在するレーンだけにはっきりしたハイブリダイゼーションシグナルが検出できた。

### 実施例2

Bordetella pertussisは、百日咳の原因となる因子である。再度の予防接種キャンペーンにより、この病気は先進国では殆ど問題ではない。しかしながら第3世界の国々に於いては、Bordetella pertussisは、幼児の致死率のトップである。

3種類のBordetella種 (Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica) の株は非常に関連しているので (KL00Sら, Int. J. Syst. Bacteriol. 31:173-176, 1981; DE LEYら, Int. J. Syst. Bacteriol. 36:405-414:1986) 、ひとつの遺伝子種に属するものとして考えるべきである。この遺伝子型の関係は、これらの細菌の他の多くの特徴にも反映するので、その表現型の差別化が冗長となる。

百日咳の臨床兆候はたいてい非定型であり、検査室診断が必要である。感度が高く、特異的で迅速な試験はまだ無い。培地には選択方法が残っているが、回収率は低き且つ結果は通常、接種後3~7日しか有効でない(FR IEDMAN, Clin. Microbiol. Rev. 4:365-376, 1988; HALPERIN

ら, J. Clin. Microbiol. 27:752-757, 1989) 。DNAプローブベースの分析は、Bordetella pertussis感染の診断を非常に改良し得る。

Bordetella pertussisの検出用プローブは、文献 (PA RKら, FEMS Microbiol. Lett. 52:19-24, 1988; McPHEAT及 びMcNALLY, J. Gen. Microbiol. 133:323-330, 1987及びFEM S Microbiol. Lett. 41:357-360, 1987; McLAFFERTYら, Abs tracts of the Annual Meeting of the American Socie ty for Microbiology C-168, 1986及びC-322, 1987) に記載されている。McLAFFERTYら(1986及び1987)に記載のプローブは、特異性が高くない。記載の他のプローブに関しては、示されたデータは特異性及び感度の度合いを推論するには不十分である。

以下の株のリボソームRNA遺伝子の一部を酵素的に増幅し、プラスミドベクター:Bordetella pertussis ATCC 10380、Bordetella parapertussis NCTC 5952 (型株)及びBordetella bronchiseptica NCTC 452 (型株)にクローン化した。種々の種類のクローン化したフラグメントを、ジデオキシ鎖停止法を使用して一部配列し、その配列を比較した。16S rRNA遺伝子に拘わる配列情報は、種一特異性プローブが与えられないことを示している(ROSSAUら、未発表)。しかしながら図2のアライメントに示されたように、相同でないエリア(271塩基対~約300)がBordetella pertussis及びBordetella bronchiseptica株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域に知見された。

Bordetella parapertussis株のスペーサー領域の配列は、Bordetella bronchiseptica配列と大体同一である (ROSSAUら、未発表)。

Bordetella pertussisのスペーサー領域のヌクレオチド271と295との間のエリアから、以下の配列:

## CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT BPI1

を有するオリゴヌクレオチドプローブを誘導した。 オリゴヌクレオチドプローブを化学合成し、ターミナルトランスフェラーゼを使用してジゴキシゲニンーUTP でラベルした。ターゲットとしてドットースポットし、 変性したゲノムDNAで得られた結果を以下の表にまとめ た。

陽性株数/	試験株数
-------	------

Bordetella pertussis	4/4
Bordetella parapertussis	0/3
Bordetella bronchiseptica	0/3
Alcaligenes denitrificans	0/1
Alcaligenes paradoxus	0/1
Oligella ureolytica	0/1
Oligella urethralis	0/1
Taylorella equigenitalis	0/1
Pseudomonas cepacia	0/1
Pseudomonas solanacearum	0/1
Comamonas testosteroni	0/1
Neisseria meningitidis	0/1
Branhamella catarrhalis	0/1
Haemophilus influenzae	0/1

使用条件下に於いて、プロープBP11はBordetella per tussisに対し100%特異性で且つ100%の感度であることを証明した。

ハイブリダイゼーション混合物は、 $5 \times SSC$ の代わりに $3 \times SSC$ ( $1 \times SSC:0.15M$  NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで添加したことを除いて、非一放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートに記載のものと同じであって。洗浄液は $3 \times SSC$ 、20%ホルムアミド及び25mリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は55%であった。

逆ドットーブロット分析を利用すると、上記表に示されているのと本質的に同一結果が得られた。この分析は 以下のように実施した:

異なる細菌種から得られた種々の株からの殺菌DNA1ng を、ジオキシゲニンー11-dUTP (Boehringer Mannhei m) を増幅混合物に添加して最終濃度40 µ Mとした以外 には、GeneAmpキット (Perkin Elmer Cetus) の製造業 者により推奨されるように酵素的に増幅した。プライマ -AP16及びAP23 (実施例1参照)を用いて全部で50μ() で30サイクル(1分/95℃,1分/50℃,1分/72℃)実施 し、その後各PCR混合物の5μ()を膜の存在下にハイブ リダイゼーション混合物(上記定義通りの組成物)1ml に添加し、これにプローブBPI1の0.2pmo1、0.02pmo1及 び0.002pmolを固定した。ハイブリダイゼーションを55 ℃で1時間実施した。洗浄工程を同一温度で10分間実施 した。非一放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringe r Mannheim製) に記載の如く検出した。ゲル電気泳動及 び逆ドットーブロットプロトコルを使用する臭化エチジ ウム染色後に実験した全サンプル中にはっきりしたバン ドを検出したが、もっぱらBordetella pertussis DNAが存在するサンプルにはっきりした陽性シグナルが得られた。

### 実施例3

Moraxella catarrhalisまたはNeisseria catarrhalis とも知られるBranhamella catarrhalisは、特殊培養基 を必要とする生化学的に不活性な細菌である。近年、そ の重要な病原体としての潜在能力が認識された。

Branhamella catarrhalisは、重い気道感染症によく含まれる (HAGERら, Rev. Infect. Dis. 9:1140-1149, 1987)。 Branhamella catarrhalisの診断には、特殊培養基を必要としない微生物による異常増殖により阻止されるこの生体の培地と、この生体と口腔内に存在する共動生物 (例えば、Neisseria種など)とを区別するための一組の表現型試験器具とが必要である。

時々、表現型が類似の細菌由来のBranhamella catarr halisを差別化する試験が限られているので、表現型試験は、推定上のBranhamella catarrhalis単離物の識別に関しては決定的ではない(RIOU及びGUIBOURDENCHE, Drugs 31 [補追.3]:1-6,1986)。分析に基づいてDNAプローブを使用すると、Branhamella catarrhalisの検査室診断をかなり簡素化できる。未特定DNAフラグメントから誘導し、Neisseria caviae由来のDNAで交差ハイブリダイズしたBranhamella catarrhalis用とDNAプローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている(Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No. D-249, 1989)。

Branhamella catarrhalis ITG 4197のrRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ鎖反応法により酵素的に増幅させ、プラスミドベクターにクローン化した。続いて16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるフラグメントをジデオキ

シ鎖停止法により配列した。この配列は図7に示されて いる(上列)。配列データより、以下のオリゴヌクレオ チド:

#### TTAAACATCT TACCAAAG

BCI 1

を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5′末端でポリヌクレ オチドキナーゼで<sup>23</sup>Pラベルし、ハイブリダイゼーショ ンプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる 位置の31 Branhamella catarrhalis株及び他の細菌分類 の19株のドットースポットした。変性ゲノムDNAを使用

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSC(1×S SC: 0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、 25mMリン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムア ミド (20%, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清ア ルブミン (0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02 %, w/v) 及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA (0.1  $mg ml^{-1}$ ) であった。洗浄液は、 $3 \times SSC$ 、20%ホルムア ミド及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイ ブリダイゼーション及び洗浄温度は、30℃であった。

使用条件下で、プローブBCI1を総てのBranhamella ca tarrhalis株にハイブリダイズした。他の細菌種の属す る試験した株は総て、このプローブに対し強いハイブリ ダイゼーションシグナルを与えなかった。

### 試験した非一Branhamella catarrhalis株は:

Moraxella	lacunata	ATCC 17967
Moraxella	lacunata	ATCC 17952
Moraxella	bovis	ITM 1601
Moraxella	nonliquefaciens	ATCC 19975
Neisseria	cuniculi	ITM 3388
Neisseria	ovis	NCTC 11227
Neisseria	caviae	ATCC 14659
Alysiella	sp.	ATCC 29468

Moraxella osloensis LMG 1043 ATCC 17974 Moraxella osloensis "Moraxella paraphenylpyruvica" LMG 5125 "Moraxella camembertii" LMG 7022 Psychrobacter immobilis LMG 6784 Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23005 Escherichia coli Haemophilus influenzae NCTC 8143 Eikenella corrodens NCTC 10596 LMG 958 Xanthomonas maltophilia Xanthomonas campestris LMG 568 であった。

実施例4

軟性下疳の原因となるHaemophilus ducreviは、特殊 培養基を必要とするグラム陰性細菌である。この生体の 培地は、困難で且つ感度が無いが、依然として、Haemop hilus ducreyi感染の診断のための選択方法である。特 異性の高いプローブを使用すると、培地が不要で且つ診 断の感度が強くなる。他のHaemophilus及びPasteurella 種と弱い交差反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子 をターゲットとするHaemophilus ducreyi用のクローン 化したDNAプローブは、PARSONSらにより記載されている (J. Clin. Microbiol. 27:1441-1445, 1989) .

Haemophilus ducreyi CIP 542型株のrRNA遺伝子の一 部をポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅し、プラス ミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列 は、ジデオキシ鎖停止法により得られた。核酸配列よ り、以下のオリゴヌクレオチド:

#### HDI 1 TTATTATGCG CGAGGCATAT TG

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5′末端で<sup>32</sup>Pラベルする か、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジ ゴキシン化UTPでその3′末端を結合し、ハイブリダイ ゼーションプローブとして使用した。

ターゲットとして、種々の位置からの41 Haemophilus ducrevi株及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ド ットースポットした変性したゲノムDNAを使用した。総 てのHaemophilus ducreyi株にもっぱらハイブリダイズ したオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、5×SSCの代わ りに3×SSC (1×SSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナト リウム, pH7.0) を使用し、ホルムアミドを20% (v/v) まで添加したことを除いて、3×SSC、25mMリン酸カリ ウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%, v/

v)、Ficol1 (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン (0.0 2%, w/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v)及び シェアをかけて変性したサケ精液DNA  $(0.1 \text{mg ml}^{-1})$  ま たは、非一放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringe r Mannheim製) のプロトコルシートの溶液であった。洗 浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩 緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及 び洗浄温度は、40℃であった。

試験した非一Haemophilus ducreyi株は:

Escherichia coli MC 1061

Escherichia coli B

Actinobacillus actinomycetemcomitans NCTC 9710

Actinobacillus lignieresii NCTC 4189

Haemophilus aphrophilus NCTC 5906

Haemophilus influenzae NCTC 8143

Histophilus ovis HIM 896-7 Pasteurella multocida NCTC 10322 Branhamella catarrhalis ITM 4197 Comamonas testosteroni ATCC 17407 Oligella urethralis LMG 6227 Neisseria gonorrhoeae ITM 4437 Campylobacter jejuni CCUG 11284 Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055 未識別株ITM 3565 であった。

実施例 5

グラム陰性細菌種Haemophilus influenzaeは、2種類 のバイオグループ: influenzae及びaegyptiusに分類する ことができる (Casinら, Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 1 37B:155-163,1986)。influenzaeバイオグループの生 体は、重要な呼吸器道の病原体であり、子供の脳膜炎及 び耳炎の原因でもある。バイオグループaegyptius単離

物は、暑い気候では、細菌性結膜炎の原因として作用す る因子であり、ブラジル紫斑熱と関連しているらしい (Brenner 5, J. Clin. Microbiol. 26:1524-1534, 198 8)。分類可能な及び非一分類可能なHaemophilus influ enzaeは、核酸プローブにより迅速に検出され得る。

この種のDNAプローブは、文献に記載されている(Ter pstra5, Scand. J. Infect. Dis. 19:641-646, 1987; Maloui nら, J. Clin. Microbiol. 26:2132-2138, 1988) 。これら のプローブは16S-23S rRNAプペーサー領域から誘導さ れているものではない。

Haemophilus influenzae NCTC 8143型株のrRNA遺伝式 の一部を、ポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅さ せ、次いでプラスミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列 がジデオキシ鎖停止方法により得られた。核酸配列か ら、以下のオリゴヌクレオチド:

### TTGACCGCAC ACGCATCAAA

TT

HII 1

#### ACTTTGAAGT GAAAACTTAA

A G

HII2

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5<sup>1</sup>末端で<sup>32</sup>Pラベルし、 ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ター ゲットとして、細菌の分類単位のドットースポットし た、変性したゲノムDNAを使用した。

両方のプローブを使用したハイブリダイゼーション結 果を以下の表にまとめた。使用したハイブリダイゼーシ ョン及び洗浄温度では、プローブHII1はHaemophilus in fluenzaeバイオグループaegyptius株にハイブリダイズ しなかった。プローブHII2は、両方のバイオグループの 株にハイブリダイズした。両方のプローブは、表示温度 で、Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belguim から得た他の15種類のHaemophilus influenzaeバイオグ ループinfluenzaeの臨床単離物にもハイブリダイズし た。

ハイブリダイゼーション混合物は、3×SSC、25mMリ ン酸カリウム緩衝液, pH7、脱イオン化ホルムアミド(20 %, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン (0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v) 及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA (0.1mg m  $1^{-1}$ ) であった。洗浄液は、 $3 \times SSC$ 、20%ホルムアミド 及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。

分類単位	プロ	プローブ		
	HII1(50°C)	HII2(30℃)		
Haemophilus <u>influenzae</u> (が付かっす <u>influenzae</u> )NCTC 8143	+	+		
Haemophilus <u>influenzae</u> (バイオグループ <u>influenzae</u> ) ITM 3837	+	+		
Haemophilus influenzae(バイオクループ argyptius) ITM 859	_	- <del>1</del>		
Haemophilus parahaemolyticus ITM 402	_	_		
Haemophilus parainfluenzae ITM 1094	_			
Haemophilus aphrophilus NCTC 5906	<del>-</del>	-		
Haemophilus ducreyi CIP 542	_	_		
Pasteurella multocida NCTC 10322	_	i –		
Pasteurella picida ATCC 17911		_		
Actinobacillus <u>lignieresii</u> NCTC 4189	_	_		
Actinobacillus actinomycetemcominitans NCTC 9710	_			
<u>Histophilus ovis</u> HIM 896-7	<del></del>	}		
Pseudomonas cepacia ATCC 25609	_			
Actinetobacter calcoaceticus ATCC 23055	_	_		
Branhamella catarrhalis LMG 5128	_	_		
Bordetella pertussis NCTC 8189	-	-		
Escherichia coli B	_	_		
Neisseria meningitidis NCTC 10025	_			

# 【第1図】

AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50

AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA	-50
TGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGGAAACCGG	
- I COOGANGANGCI TGAG TGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGGAAACCGG	-100
MCCCC33C33CC0MCC3CMC33CCCC33CCMMCCCCMT54C55C5CCCC	100
13000MOMOCITONO I OMNOGOMAGGI I CGC I TANGANGGANACCGG	-100
GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGTCGGA	-150
GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGTCGGA	-150
GGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGGCATAGCTCAGTTGGT	-200
	-200
CCMMCA & CMCCMCCCA CO CO CO A CO A CO A CO A CO	~200
	-200
	-250
AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCCGTTTGCCT	-250
CCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAGCTTAT	-300
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::	-300
CCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAGCTTAT .	-300
	500
TTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC	
TTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC	
【第9図】	
AAGGATAAGGAACTGCGCATTG-GTCTTGTTTAGTCTTGAGAGGTCTT	-47
AAGGATAAGGAACTGCGCATTG-GTCTTGTTTAGTCTTGAGAGGTCTT	
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT	-50
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC	-50
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC	-50 -97
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC	-50 -97 -100
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC	-50 -97 -100
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC	-50 -97 -100 -147
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC	-50 -97 -100 -147
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC	-50 -97 -100 -147 -148
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT	-50 -97 -100 -147 -148
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT  ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT	-50 -97 -100 -147 -148 -176
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT  ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT	-50 -97 -100 -147 -148 -176 -198
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT  ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT  TCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCACGATCTAGAAATAGATT	-50 -97 -100 -147 -148 -176 -198
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT  ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT  TCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCACGATCTAGAAATAGATT AGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGT-AGTATT-AATAAG	-50 -97 -100 -147 -148 -176 -198 -218
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT  ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT  TCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCACGATCTAGAAATAGATT AGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGT-AGTATT-AATAAG  GTAGAAAGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGTGAATATTTAATGAG	-50 -97 -100 -147 -148 -176 -198 -218
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT  ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT  TCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCACGATCTAGAAATAGATT AGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGT-AGTATT-AATAAG  GTAGAAAGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGTGAATATTTAATGAG  AGTTTATGACTGAAAGGTCAGAAAATAA -246	-50 -97 -100 -147 -148 -176 -198 -218
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTT  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAAGTAATGC  AGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAATTGT  ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT  TCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCACGATCTAGAAATAGATT AGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGT-AGTATT-AATAAG  GTAGAAAGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGTGAATATTTAATGAG	-50 -97 -100 -147 -148 -176 -198 -218

# 【第2図】

AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGTTGTTAT	-50
AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGTTGTTAT	-50
ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGGTTTCGCGGG	-100
***************************************	
ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGGTTTCGCGGG	-100
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGGTCGTTG	-150
:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGGTCGTTG	-150
GTTCGAATCCAACCAGACCCACCAAGGTTTCCTGAGAGGGAAATGGGGGT	-200
:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
GTTCGAATCCAACCAGACCCACCAAGGTTTCCTGAGAGGGAAATGGGGGT	-200
GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTC	-250
***************************************	
GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTC	-250
GATCCCGTTCACCTCCACCAAAGCCTGTCCAGAGGATGGGTGTGGNNNG-	-299
*************************************	
GATCCCGTTCACCTCCACCAGAGCCCGTCTTGAAGATGGGAGCGGGTTGG	-300
AGACCAG-AAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG	-342
CAGGCGAGACCAGGAAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG	-350
TTAAGCGTTGGGTTTTGGCCGACAGCTATATATGTTCTTTAACAATTTGG	-392
***************************************	
	-400
AAGAAGCACAACGTAAAGTGTTCGTTTAGTAGTCGGCGCGAGTCGATGAA	-442
AAGAAGCACAACGTAAAGTGTTCGTTTAGTAGTCGACGCGAGTCGATGAA	-450
GACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTCCAAGTCTCAAGAACTG	-492
GACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTCCAAGTCTCAAGAACTG	-500
GCTGGGCGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACTTATGAACGGCACA	-542
GCTGGGCGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACTTATGAACGGCACA	-550
AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG -582	
***************************************	
AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG ~590	

# 【第3図】

AGAGAAAGAAGAGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAAAAG	÷50
AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAAA-G	4.0
TICHOLOGICATION CONTINUE TO A CALL T	-47
ATGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGATTCGCTTAAGAAGAAGAATCCG	-100
ATGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGGAAACCG	-99
GGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGTCGG	-150
**************************************	
GGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGTCGG	-149
AGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGGGCATAGCTCAGTTG	-200
AGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGG-CATAGCTCAGTTG	-198
GTAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCCGTTTGC	-250
GTAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCCGTTTGC	-248
CTCCACCAATACTGTACAAATCAAAACGGAAGAATGGAACAGAATCCATT	-300
********** *** *** * * * * * * * * * * *	
CTCCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTT	-280
CAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAATGCTGATATAATAATCAG	-350
***** * * * * * * * * * * * * * * * * *	_
TGCTGTTTTTAGCAG	-295
CTCGTTTTGATTTGCACAGTAGATAGCAATATCGAACGCATCGATCTTTA	-400
:: :::::::::::::::::::::::::::::::::::	
CTTATTTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGA-CGCATCGATCTTTA	-339
ACAAATTGGAAAGCCGAAATCAACAAACAAAGACAAAGCGTTTGTTT	-450
ACAAATTGGAAAGCCGAAATCAACAAACAAAGACAATGAGTTTGTTT	-389
TTTTTTATTCTTTGCAAAGGATAAAAAATCGCTCACAAGAGAAAAGAAAA	-500
TTTTTTTTTCTTTGCAAAGGATAAAAAATCTCTCGCAAGAGAAAAGAAAA	-439
CAAACACAGTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAACCCTGAAACACAA	-550
	-554
CAAACATAGTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAATCCTGAAACACAA	-489
AAGGCAGGATTAAGACACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCAAAGTAGGAAA	-600
************************************	
AAGGCAGGATTAAGACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCAAAGTAGGGAT	-539
TTCAAGTCTGATGTTCTAGTCAACGGAATGTTAGGCAAAGTCAAAGAAGT	~650
******* ** * ********	
TTCAAGTTTGCTTACTTAGTCAACGGGTAGGTAAACGAAGTCAAAGAAGT	-589
TCTTGAAATGATAG -664	
***************************************	
TCTTGAAATGATAG -603	

# 【第4図】

A-GAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAA	-47
: ::: :: : : : : : : : : : : : : : : : :	
AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGTTGTTG	-46
101mcccc11c11ccmmc1cmc11cco11ccmmcccmm11c11cc	^-
AGATGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGGAAAC	-97
TTATATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCT-GATCCGAGAGAGAGAGGTTTC	0.5
TINININGCIGCIGGATCGGTGGCTGCT-GATCCGAGAGAGAGAGGTTTC	-35
-CGGGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGT	-146
iiiii iiiiiiiii iiiiiiiiii iiiiiiiiii iiii	140
GCGGGTCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCCGTCTTGATAAGGCGGGGGT	_145
	-147
CGGAGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACG	-181
CGGAGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACG	
CGTTGGTTCGAATCCAACCAGACCCACCAAGGTTTCCTGAGAGGGAAATG	-195
GGGGCATAGCTCAGTTGGTAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGTCATC	-231
1111 1111111 111 11111 1111111111111111	,
GGGGTGTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATC	-245
CCDMCC1MCCCCMMDCCCMCC1.CC1.1.1.1.0mmm. C1.1.1.0mm	
GGTTCGATCCCGTTTGCCTCCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTT	-281
COMMOCAMOCACOMMCACCACAAAACCAMOCAACACACAC	
GGTTCGATCCCGTTCACCTACCAAAGCCTGTCCAGAGGATGGGTGTGG	-295
GCTGTTTTTAGCAGCTTATTTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATC	221
: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::	-331
NNNGAGACCAGAAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTC	_220
William Control of Con	-336
GATCTTTAACAAATTGGAAAGCCGAAATCAACAAACAAAGACAATGAGTT	-381
	201
AGTGTTAAGCGTTGGGTTTTGGCCGACAGCTATATATGTT	-378
TGTTTTGATTTTTTTTTTTGCAAAGGATAAAAATC-TCTCGCAAGAG	~430
CTTTAACAATTTGGAAGAAGCACAACGTA-AAGTGTTCGTTTAGTAGTCG	-427
AAAAGAAAACAAACATA-GTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAATCC	-479
GCGCGAGTCGATGAAGACGGATACGGGTTGTGATTGCAT-GATTTGTTC	476
GCGCGAGTCGATGAAGACGGATACGGGTTGTGATTGCAT-GATTTGTTC	-4/0
TGAAACACAAAAGGCAGGATTAAGACACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCA	-520
i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	-349
CAAGTCTCAAGAA-CTGGCTGG-GCGGCCAAGC-GTTTGGTCA	-516
organism organism organism of an allegica	-210
AAGTAGGGATTTCAAGTTTGCTTACTTAGTCAA-CGGGTAGGTAAACGAA	-578
:: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
GA-TGCTTTGAACTTATGAACGGCACAAGCGCGAATGAACAGCAC	-560
GTCAAAGAAGTTCTTGAAATGATAG -603	
: :::: :: : : : :::::	
CTATAAGACTTTAGTGTTATAG -582	

# 【第5図】

AC	GAAG	-TT	-AT	-CTGATT	GGCAA	-GAA	-24
: AGAGAAA	:::: GAAGGGG	:: CTTTAGG(	:: CATTCACA	CTTATC	GGTAAAC	TGAAAAGA	-50
						-AAAC-GG	-64
TGCGGAA	GAAGCTT	: Cagtgaa	GCAAGG"	TCGCTT	'AAGAAGG	GAAACCGG	-100
						G-GGTCAT	-113
GTTTGTA	GCTCAGC	rggttag/	GCACAC	CTTGAT	AA-GCGT	GAGGTCGG	-149
AAGTTCA	AGTCTTA	TAGACC	CACCATT	DDDD-T1	CCATAGO	TCAGTTGG	-162
AGGTTCA	AGTCCTC	CCAGACC	CACCAAG	AACGGGG	GCATAG	TCAGTTGG	-199
						TCCTTGGC	-212
TAGAGCA	CCTGCTT	TGCAAGC.	AGGGGGT	CATCGGI	TCGATC	CGTTTGCC	-249
						TAAATAAG	-262
TCCACCA	AAACT	TTACAAA	TGAAAGC.	AAGTI	TGCTGT	TITAGCAG	-295
						TATAACAT	-310
						TAACAAAT	~345
T						TTTATTA	-347
TGGAAAG						GATTTTTT	-395
						TACAAACA	-392
						AACAAACA	-445
CCAAA						GC- ::	-421
TAGTAT	rtgggtga					AAAAGGCA	~495
: :	::	:: ::	: :: :	::: ::	: ::		
						ATTTCAAG	
	::	:::::	: ::	:::::	:::::		
		CAACGGG	TAGGTAA	ACGAAGI	rcaaa <b>ga</b> i	<b>GTTCTTGA</b>	-595
GGTTGT	:						
AATGAT	AG -603						

# 【第6図】

C					-1
:					
CTTAACCTTCGGGAGGGCGCT	PACCACTT	TGTGATTC	ATGACTGG	GGTGA	-50
CAAAATAAAG	3AC-		-ATCAC		-18
CAAAATAAAG	: ::		:::::		
AGTCGTAACAAGGTAACCGTAG	GGGAACC'	TGCGGTTG	GATCACCT	CTTA	-100
AAGTA	CTCA	CACAGATT	GTTTGATT	TTTT	-48
;;; ;	::::	:::::::	:: :::: :	;	
CCTTAAAGAAGCGTACTTTGTA	AGTGCTCA(	CACAGATT	GTCTGATAC	AAAG	-150
AGACAAGTCG			GAATA	\ <b>-</b>	-63
TGAAAAGCAAGGCGTTTACGCC	STTGGGAG	<b>IGAGGCTG</b>	aagagaata	AGGC	-200
CATCTTT			AAATGT		-76
CGTTCGCTTTCTATTAATGAAA	AGCTUACCO	CTACACGA	AAATATCAC	GCAA	-250
re	TCCCCAT	CTGTCTAG	AGGCCTAGG	ACAT	-106
::	:::::: ::		::::: :::	:::	
CGCGTGATAAGCAATTTTCGTG	TCCCCTT	C-GTCTAG	AGGCCCAGG	ACAC	-299
CGCCCTTTCACGGCGGTAACCG	GGGTTCG	AANCCCC-	-GTGGACGC	CATC	-154
:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::	::::::::		: ::::::	:::	
CGCCCTTTCACGGCGGTAACAG	GGGTTCG/	ATCCCCT!	AGGGGACGC	CA-C	-348
TAAAGATGATTTTT-ATTGTCT	TATGTT	-CTTTAAAJ	<b>NAAATAGAA</b>	ACAA	-201
: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::	:	: :::: ;	: ::	:	
TTGCTGGTTTGTGAGTGAAA	GTCGCCGA	CCTTAATA	TCTCAAAA	CTCA	-396
GCTGAAAACTGAGAGATT	TTCTAAAC	TAGAAAGT	CTGAGT-A	ATCT	-246
:: : : :::::	::	: ::::	::: :::	: ::	
TCTTCGGGTGATGTTTGAGATN	TTTGCTCT	<b>CAAAATT</b>	CTGGATCA	AGCT	-446
AAAATCTTAGCTGAACAAA				CATT	-293
::: : : ::::::::				:::	
GAAAATTGAAACACTGAACAAC	GAGAGTTG	TTCGTG-A	GTCTCTCA	LATT	-495
<b>AACCACAAGTATATCAATATGC</b>					-343
: ::: :::					
TTCG-CAACACGATGATGA	ATCGA	-AAGAAAC	ATCTTCGG	ettg	-537
TAT -346					
1					
TGA -540					

# 【第7図】

ACGAAGTTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTTGTTCTTTGGTAAG	-50
:::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::	
ACGAGATTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTTGTTCTTAG-TAGT	-49
ATGTTTAAAAACGGGTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTTGATA	-100
: :::: :::::::::::::::::::::::::::::::	
GTAAGTTAAATTGGGTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGCCTTGATA	-99
ACGCGGGGGTCATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGCCA	-150
: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
AGGCGGGGTCATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGTTA	-149
TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCG	-200
1::::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCG	-199
ACTCTCCTTGGCTCCACCAAGCAAGTTTAAACATCAAAGCATACATAA	-248
1::::::: : : : : : : : : : : : : : : :	
ACTCTCCTTAACTCCACCACTTACAATAAATGAGAACTAAGCAATCAAAT	-249
GCAATTTAAATAAGATTTCTTATTTATGCTTTTATTTTATA	-289
11 1 1111 111111111 11 1 1111 11 1 1 1 1	
TAGATAACATAAAATTAGATTTCTTACTTCTACTTTATGTAGATGACTTA	-299
AACTGACGAAGTTTATAACA-TTATTTAACAACATAG-TATGAGT	-332
CAATTAACTGATGAAGTTAATTTCAATTATTAACAACGTATATATGAGT	-349
CTGGGTTAATTATTTAATTCCAACAAATAATTAACCTGGTGTTTGTAC-C	-381
CTGGGTTAATTAATTCCAACAAATAATTAACCATTCCGTCATACTC	-399
CAATACAAACACCAAAA :: ::::::::::::::::::::::::::	-398
:: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
CACATCAAGCATATAAAGTTAAAACTTTTAGTATGATGATGATCGGATA	-449
AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT	-448
AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT	-499
ACCCATACACCCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT	-498
ACCCATACACACCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT	-549

# 【第8図】

CTGAAGACGAGACAGCGAGTGCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG	-50
: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
CCCAAGACGAGACAGCGAGTGCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG	-50
ACAAGATTAAAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAG	-100
ACAAGATTAAAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAG	-100
ATAAAAAGAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCCATCGTCTAGAGGC	-150
1;:::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
ATAAAAAGAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCCATCGTCTAGAGGC	-150
CTAGGACATCGCCCTTTCACGGCGGTAACCGGGGTTCGAATCCCCGTGGG	-200
CTAGGACATCGCCCTTTCACGGCGGTAACCGGGGTTCGAATCCCCGTGGG	~200
ACGCCAATTAAAGATAACTTTATTAGATTGTCTTACTGTTCTTTAAATTT	-250
ACGCCANNNUNNNUNTTTATTAGATTGTCTTACTGTTCTTTAAAAA	-250
TTGGAAACAAGCTGAAAACAAGAGATTTTCGAGAGAAAGTCTGAGTAGGC	-300
TTGGAAACAAGCTGAAAACAAGAGATTTTCGAGAGAAAGTCTGAGTAGGC	~300
AAGATAGGAAAGTGAGAGGAGGGAACTGAAAAGGGAACTCTAAAAACAAA	~350
AAGACAGGAAAGTGAAAAGAGGGAACTGAGAAGGAAACTCTAAAAACAAA	-350
ACCTGTTTTGCATAAAA-TCTTGATTGAACAAAAGCAATCAAGTGTTTAG	-399
-CCTGTTTTGTAAAAAATCTTGATTGAACAAAAGTAATCAAGTGTTTAG	-399
TTGAATGAAAATACGCATCAAATTGACCGCACTTTGAAGTGAAAACTTAA	-449
TTGAATTAATGAGGCTGAAAGTGCAGTCAAAGTACGGTATCTATTTTA	-447
-AGTGATTGAAAACATTTGAGGTGAT -474	
: ::: ::::::::::::::::::::::::::::::::	

## 【第10図】

TAAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAATATAAAATACAAACTC	-50
TAAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAAATATAAAATACAAACTC	-50
TATACTTAGATTTATTTTTATCTTTAACTATAAAAGAATATACTTTAATA	-100
TATACTTAGATTTATTTTTATCTTTAACTATAAAAGAATATACTTTAATA	-100
AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTTATAATGAGATTATTT	-150
AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTTATAATGAGATTATTT	-150
	-200
AATATATATGCTTCCTTTAGGTTTTAAACCTAAATGTTCTTTTTAATTAT	~200
CATTGTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTTAATAAAAACAATTTTACAGGACT	-250
CATTGTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTTAATAAAAACAATTTTACAGGACT	-250
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	-300
TGTTAAAGGATAAAACCTATTTATCTTTTCTTTGGTTTAACTTATATCTT	-300
	~350
TTAATTATCTTTATTTCTATAATAAAGAGAATATTAGATTTAAGATTTAT	~350
AAATTAAAGACAAGTTTCAAACTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT	-400
AAATTAAAGACAAGTTTCAAACTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT	-400
	-450
AGTTTTATATTAAGTGTTTGAATGCTTTCCGTCTTAAGATAAAGAAGTCT	-450
	-500
TATCATAAAAACTTTAACAAGGAAGTGATGCGTTTTAGAATCAATAATAA	-500
AAGGTAAAAA -511	
AAGGTAAAAA -511	

フロントページの続き

(72) 発明者バン・フーベルスウイン, ヒユーホ<br/>ベルギー国、ベー―9288・ラールネ、コ<br/>ルマンストラート・62(56) 参考文献<br/>(56) 参考文献特表 昭60-501339 (JP,A)<br/>「生化学辞典 第1版」東京化学同人<br/>(昭59. 4. 10) P. 1343<br/>Mol. Gen. Genet., 193<br/>(1984) P. 427-430